

J Kreusch

Freiburg im Br 1979



LEBERZELLEN UND MAKROPHAGEN IN KULTUR :
BINDUNG UND ABBAU VON INSULIN UND GLUCAGON

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Jürgen Kreusch
aus Lübeck

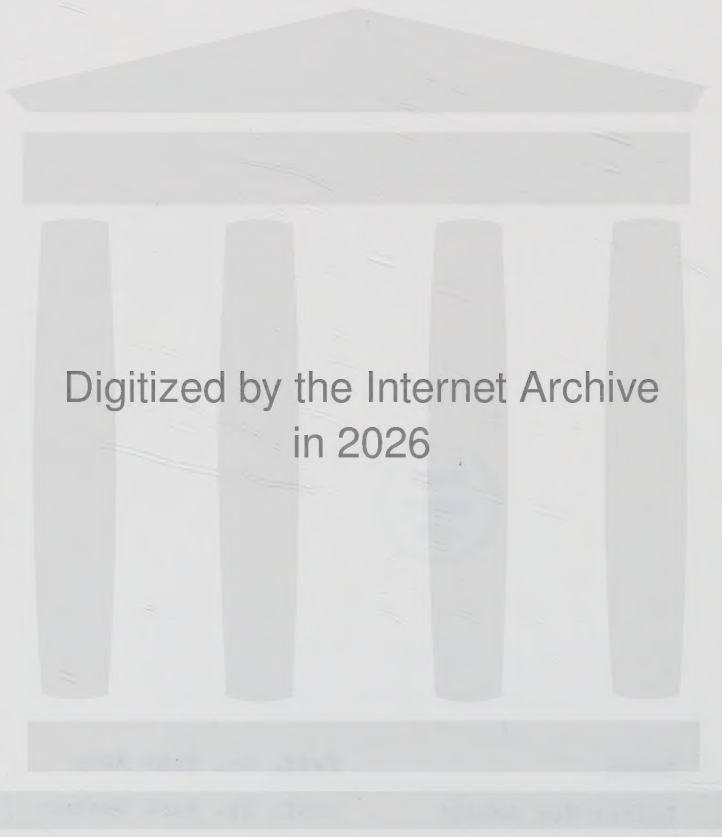
1979



7

Dekan	Prof. Dr. Hans Mohr
Leiter der Arbeit	Prof. Dr. Karl Decker
Referent	Prof. Dr. Karl Decker
Korreferent	Dr. F. Wunderlich

Tag der Verkündigung des Prüfungsergebnisses :



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543108_0003

Ich danke

Herrn Prof. Dr. Karl Decker für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für die vielfältige Förderung während der Zeit dort.

Herrn Dr.Dr. F. Hofmann für die gute Zusammenarbeit und für viele sehr hilfreiche Diskussionen und Anregungen.

Frau C. Aehnelt und ganz besonders Frau A. Leonhardt für ausdauernde technische Assistenz .

Herrn H.P. Henninger und Herrn B. Zimmermann für umfangreiche technische Hilfestellung.

Herrn Dr. P.G. Munder für großzügige Unterstützung beim Einarbeiten in die Techniken der Zellkultivierung.

Meinen Arbeitskollegen für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Die vorliegende Arbeit wurde am Biochemischen Institut der Universität Freiburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Karl Decker in der Zeit von November 1976 bis März 1979 durchgeführt.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

SEITE

A.	EINLEITUNG	1
B.	ERGEBNISSE	4
1.	Gewinnung und Kultivierung von Leberzellen und Makrophagen	4
1.1.	Gemeinsame Isolierung von Hepatozyten und Sinusoidalzellen	4
1.1.1.	Auswahl der Präparationsmethode	5
1.1.2.	Vitalitätskriterien für Hepatozyten	12
1.1.3.	Vitalitätskriterien für Sinusoidalzellen	18
1.2.	Kultivierung von Hepatozyten	20
1.2.1.	Vitalität der Hepatozytenkulturen	26
1.3.	Kultivierung von Kupfferzellen	32
1.4.	Kultivierung und Charakterisierung von Alveolarmakrophagen	42
2.	Bindung und Abbau von Peptidhormonen	45
2.1.	Bindung und Abbau von Insulin	49
2.1.1.	Bindung und Abbau von Insulin durch Hepatozyten	50
2.1.2.	Bindung und Abbau von Insulin durch Kupfferzellen	55
2.1.3.	Bindung und Abbau von Insulin durch aktivierte und nichtaktivierte Alveolarmakrophagen	59
2.1.4.	Bindung von Insulin durch Peritonealgranulozyten und Knochenmarksmakrophagen	62
2.2.	Bindung und Abbau von Glucagon	64
2.2.1.	Bindung und Abbau von Glucagon durch Hepatozyten	66
2.2.2.	Bindung und Abbau von Glucagon durch Kupfferzellen	68
2.2.3.	Bindung und Abbau von Glucagon durch nichtaktivierte Alveolarmakrophagen	69

C.	DISKUSSION	71
D.	ZUSAMMENFASSUNG	88
E.	EXPERIMENTELLER TEIL	89
1.	Geräte und Chemikalien, Versuchstiere	89
1.1.	Geräte	89
1.2.	Chemikalien	90
1.3.	Versuchstiere	91
2.	Methoden	92
2.1.	Bereitung der Medien für die Perfusion und Kultur	92
2.2.	Kombinierte Präparation von Hepatozyten und Sinusoidalzellen	95
2.3.	Präparation von Hepatozyten für die Zellkultur	96
2.4.	Präparation von Sinusoidalzellen für die Kultur	102
2.5.	Gewinnung von aktivierten und nichtaktivierten Alveolarmakrophagen	104
2.6.	Gewinnung von Peritonealgranulozyten und Knochenmarksmakrophagen	106
2.7.	Bestimmung der intrazellulären Na^+ - und K^+ -Konzentrationen in Hepatozyten	107
2.8.	Bestimmung von Metaboliten	110
2.8.1.	Probenvorbereitung bei Einzelzellen	110
2.8.2.	Probenvorbereitung von Zellkulturen	111
2.8.3.	Bestimmung von ATP	112
2.8.4.	Bestimmung von UDPG und UTP	112
2.8.5.	Bestimmung der säurelöslichen Uracilnucleotide als UMP (Σ UMP)	113
2.8.6.	Harnstoffbestimmung	114
2.9.	Messung von Enzymaktivitäten	115
2.9.1.	Glutamat-Dehydrogenase	115
2.9.2.	Lactat-Dehydrogenase	116
2.10.	Proteinbestimmungen	116
2.10.1.	Bestimmung nach LOWRY	116
2.10.2.	Bestimmung nach BRADFORD	116

SEITE

2.11.	DNA-Bestimmung	117
2.12.	Peroxidase - Färbungen	117
2.13.	Hormonbindungsversuche	118
2.13.1.	Reinigung von ^{125}J -Insulin an Sephadex G 50	118
2.13.2.	Hormonbindung an Zellkulturen	119
2.13.3.	Bestimmung des Insulinabbaus	120
2.13.4.	Bestimmung des Glucagonabbaus durch SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese	120
	Literaturverzeichnis	122.

Verwendete Abkürzungen

AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure-Na-salz
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-N-N'-tetraacetat
FG	Feuchtgewicht
G-1-P	Glucose-1-phosphat
G-6-PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
$^3\text{H}_2\text{O}$	Tritiumwasser
LDH	Lactat-Dehydrogenase
NAD^+	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxid. Form
NADP^+	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NDPK	Nucleosid-diphosphat-Kinase
NMPK	Nucleosid-monophosphat-Kinase
PDE	Phosphodiesterase
SDS-PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRA · HCl	Triethanolamin-Hydrochlorid
UDPG	Uridin-5'-diphosphatglucose
UDPG-P	Uridin-5'-diphosphatglucose-Pyrophosphorylase
Σ UMP	Summe säurelösli. 5'-Uracilnucleotide
UTP	Uridin-5'-triphosphat

A. EINLEITUNG

Die Analyse von Stoffwechselvorgängen im gesunden und erkrankten Organismus ist im Verlauf der letzten 150 Jahre um immer neue Methoden erweitert worden. Waren ursprünglich nur Studien am ganzen Körper und seinen Ausscheidungen sowie an fixierten Präparaten und gefärbten Schnitten möglich, so sind im Laufe der Zeit immer feinere Strukturen der Untersuchung zugänglich geworden.

Man hat gelernt, einzelne Organe isoliert zu verwenden, um mehr über ihren Beitrag zum Gesamtstoffwechsel und über ihre spezifischen biochemischen Eigenschaften zu erfahren. Da kein Organ nur aus Zellen eines einzigen Typs besteht, wurden in der Folge einzelne Zellen und subzelluläre Strukturen in die Untersuchungen mit einbezogen, so daß man zu Aussagen über Vorgänge auf molekularer Ebene kam.

Bei der Aufrechterhaltung des biochemischen Gleichgewichts im Körper nimmt die Leber eine zentrale Rolle ein. Ihre Leistungen wie auch ihre Erkrankungen sind daher stets mit besonderem Interesse untersucht worden:

Zunächst an Dünnschnitten, später am isoliert perfundierten Organ und schließlich an Einzelzellen.

Während über die Parenchymzellen der Leber, die Hepatozyten, schon viel experimentelles Material vorliegt, ist über die zweite große Gruppe von Leberzellen, die Sinusoidalzellen, wenig bekannt. Man weiß, daß zu ihnen die Endothelzellen der Sinusoide und die Kupfferschen Sternzellen gehören (1). Besonders die letzteren sind heute Gegenstand der Auseinandersetzung: Nicht einmal über ihre Herkunft herrscht Einigkeit. Man ordnet sie dem retikuloendothelialen System zu und weiß, daß sie das in die Leber strömende Blut von Fremdkörpern reinigen und beim Abbau überalterter Erythrozyten eine Rolle spielen. Aber vieles über ihren Beitrag zur Biochemie der Leber und zum Immunsystem des Körpers liegt noch im Dunkeln.

Arbeiten in diesem Labor ergaben auch deutliche Hinweise auf unterschiedliches biochemisches Verhalten von Hepatozyten und Sinusoidalzellen (2). Bedingt durch die bisher verwendeten Präparationsverfahren, konnten aus einem Versuchstier nur jeweils die eine oder die andere Zellklasse isoliert werden. Zum direkten Vergleich wäre es jedoch besser, aus der Leber eines Tieres Hepatozyten und Sinusoidalzellen zugleich gewinnen zu können. Weiterhin wäre es für länger dauernde Versuche von Vorteil, mit diesen Zellen in Gewebekultur zu arbeiten.

Die Zahl der Fragestellungen, die mit Hilfe kultivierter Zellen lösbar erscheint, reicht von der Einordnung der Kupfferzellen ins Makrophagensystem über ihren Beitrag zum Proteinmetabolismus, ihre Membranstruktur und ihr immunologisches Verhalten bis zum Mechanismus von Phagozytose und Pinozytose. 7

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher:

1. Die gleichzeitige Isolierung von Hepatozyten und Sinusoidalzellen guter Vitalität und Ausbeute aus der Leber eines Tieres.
2. Die Kultivierung dieser Zellen und die Sicherung von Vitalität und Reinheit dieser Kulturen.
3. Die Oberflächencharakterisierung dieser Zellen in Hinsicht auf ihren Besatz mit Hormonrezeptoren sowie der Vergleich mit anderen Zellen des Makrophagensystems.

B. ERGEBNISSE

1. Gewinnung und Kultivierung von Leberzellen und Makro-
phagen

1.1. Gemeinsame Isolierung von Hepatozyten und Sinusoidal-
zellen

Die Leber ist als heterogenes Gewebe aus einer Reihe völlig verschiedener Zellarten zusammengesetzt. Die Parenchymzellen machen etwa 65 % der Zellzahl aus; wegen ihrer Größe liegt ihr Anteil am Frischgewicht des Organs aber zwischen 85 und 90 % (3). Nach den Betrachtungen SEGLENS zur "Zellularität" (d.h. der Zellzahl je Gramm Frischgewicht) enthält ein Gramm Rattenleber $114 \cdot 10^6$ Hepatozyten (4).

Obwohl die Nichtparenchymzellen also etwa 35 % der Zellzahl ausmachen, tragen sie nur mit 3 - 6 % zum Volumen der Leber bei (5, 6). Eine ausführliche Darstellung der Volumenverteilung findet sich bei BLOUIN et al. (5). Unter den Nichtparenchymzellen machen die Zellen der Sinusoide den weitaus größten Teil aus. Sie werden daher unter dem Oberbegriff 'Sinusoidalzellen' zusammengefasst. Darunter fallen die Endothelzellen und die Kupfferzellen, die zahlenmässig den größten Anteil stellen (7), sowie die Fettspeicherzellen (8) und die erst kürzlich beschriebenen sogenannten "pit cells" (9).

Im Lebergewebe finden sich weiterhin Bindegewebszellen, Gallengangsepithelien und Leukozyten (10)

1.1.1. Auswahl der Präparationsmethode

Sucht man in der Literatur nach Verfahren zur Zerlegung der Leber in einzelne Zellen, so stößt man auf eine grosse Zahl von verschiedenartigen Methoden (11 - 22)

Bei frühen Versuchen verwendete man entweder mechanische Kräfte allein (Übersicht bei 11) oder eine Kombination mechanischer Behandlung mit der Komplexierung der interzellulären Calcium- (10, 12) oder Kaliumionen (13), aber auch Perfusion mit hyperosmolarer, alkalischer Salzlösung (14). Keine dieser Methoden brachte Einzelzellen in guter Ausbeute und Vitalität.

Einen wirklichen Fortschritt bedeutete erst der Einsatz von Enzymen, die das interzelluläre Bindegewebe auflösen, ohne jedoch die Zellen anzugreifen. Heute wird nur noch nach diesem Prinzip gearbeitet, wobei sich zwei experimentelle Ansätze herauskristallisiert haben : Auf HOWARD et al. (15) geht die Inkubation von Leberdünnschnitten mit einer gepufferten Collagenase-Hyaluronidaselösung zurück. Dieses Verfahren ist in der Folgezeit verbessert worden (16, 17), es wird mit Vorteil zur Gewinnung von Einzelzellen aus Biopsiematerial oder aus Proben von Lebern grosser Tiere angewendet.

Wesentlich bessere Ausbeuten vitaler Zellen erhält man mit der Perfusionsmethode nach BERRY und FRIEND (18,19); nach SEGLEN (4) lassen sich damit nahezu 100 % aller Leberzellen in Suspension bringen. Das isolierte Organ wird mit einer sauerstoffgesättigten Lösung von Collagenase perfundiert, nach Zerfall des Bindegewebes läßt es sich in einzelne Zellen zerschütteln. Auch diese Methode ist mehrfach verbessert worden (4, 20 - 22). Sie hat sich in unserem Labor wegen der hohen Ausbeuten und der guten Vitalität der erhaltenen Zellen bewährt (32, 33).

Nach der Zerlegung der Leber in einzelne Zellen müssen die verschiedenen Zellklassen abgetrennt werden. Die Hepatozyten lassen sich wegen ihrer Größe leicht bei niedrigem Schwerefeld abzentrifugieren und reinigen. Zur Isolierung der Nichtparenchymzellen wurden verschiedene Methoden vorgeschlagen (23 - 27). Das Problem, die Verunreinigung mit Hepatozyten möglichst gering zu halten, lösten MILLS und ZUCKER-FRANKLIN elegant (28) durch die selektive Zerstörung der Parenchymzellen mit Pronase (29), einer Protease aus *Streptomyces griseus*. In einer verbesserten Form des Verfahrens (30) werden statt der ursprünglich verwendeten Leberstückchen die durch Collagenasebehandlung aus der Leber gewonnenen Einzelzellsuspensionen mit Pronase inkubiert. Dadurch konnte die Ausbeute im Vergleich zu früheren Arbeiten (31) um etwa das fünffache auf $30 \cdot 10^6$ Sinusoidalzel-

len je Gramm Leber gesteigert werden. Da jedoch alle Parenchymzellen zerstört werden mußten, waren lange Inkubationszeiten und hohe Pronasekonzentrationen erforderlich.

Ansatzpunkt für die folgenden Versuche war nun der Gedanke, bei der Isolation von Sinusoidalzellen die Hauptmasse der Hepatozyten vorsichtig abzuzentrifugieren und aus dem Überstand dieser Zentrifugation die noch verbliebenen Parenchymzellen durch kurze Inkubation mit geringen Pronasemengen zu entfernen. Neben einer beträchtlichen Zeit- und Enzymsparnis war auch eine bessere Qualität der Sinusoidalzellen zu erwarten, bedingt durch kürzere Inkubationszeit bei niedrigerer Enzymkonzentration. Parallel dazu sollten die anfangs abzentrifugierten Hepatozyten gereinigt werden.

Zunächst mußte die geeignete Inkubationszeit bei möglichst niedriger Pronasekonzentration bestimmt werden. Dazu wurde die nach rezirkulierender Collagenaseperfusion aus der Leber erhaltene Zellsuspension (s. Experimenteller Teil) bei 4°C zwei Minuten lang bei 600 upm (37 x g) zentrifugiert. Vorsichtiges Dekantieren ergab Sediment und Überstand 1. Das Sediment wurde erneut in Krebs-Henseleit-Puffer resuspendiert, zwei Minuten bei 400 upm (14 x g) zentrifugiert und der Überstand 2 abgegossen. Eine weitere Wiederholung ergab den Überstand 3 (Tabelle 1).

Das Sediment der letzten Zentrifugation bestand aus der gereinigten Hepatozytenfraktion. Diese hatten somit dieselbe Behandlung wie in früheren Arbeiten erfahren (32, 36). Nach Resuspension in Krebs-Henseleit-Puffer wurde der Anteil der Sinusoidalzellen ausgezählt. Er lag stets unter 2 %.

In den drei Überständen wurde durch Zählung in einer Neubauer-Kammer die Verteilung von Hepatozyten und Sinusoidalzellen bestimmt (Tabelle 1). Man sieht, daß im ersten Überstand 80 % der Gesamtzahl an Sinusoidalzellen enthalten sind, verunreinigt durch nur 6 % Hepatozyten. Die restlichen 20 % der Sinusoidalzellen, verteilt auf die Überstände 2 und 3, sind dagegen zu 50 % und mehr mit Parenchymzellen verunreinigt.

Die Ausbeute an Sinusoidalzellen stimmt gut mit den Angaben von WAGLE et al. (37) überein, die $179 \cdot 10^6$ Zellen aus der Leber einer 180 g schweren Ratte erhielten.

Zur völligen Zerstörung der verunreinigenden Hepatozyten sollten die Sinusoidalzellen mit Pronase inkubiert werden. Schonendere Bedingungen als in älteren Arbeiten (bis zu 90 min Inkubationszeit und 0,5 % Pronase) (29, 30, 37) waren nur auf Überstand 1 anzuwenden, in den beiden anderen Überständen war die Verunreinigung mit Hepatozyten zu hoch und der Gehalt an Sinusoidalzellen zu gering.

	Überstand 1 (37 x g)	Überstand 2 (14 x g)	Überstand 3 (14 x g)
SZ x 10 ⁻⁶	177,7 ± 29,8	29,8 ± 4,4	13,1 ± 9,2
HZ x 10 ⁻⁶	11,4 ± 1,7	28,1 ± 5,3	19,7 ± 3,6
$\frac{SZ}{HZ}$	15,6	1,06	0,66

Tabelle 1 : Verteilung der Hepatozyten (HZ) und Sinusoidalzellen (SZ) in den Überständen 1 bis 3 der Differentialzentrifugation. Angegeben ist die durchschnittliche Gesamtausbeute je Tier (Gewicht 184 ± 8 g) und die Standardabweichung (n = 6).

Um die günstigsten Inkubationsbedingungen zu finden , wurde der erste Überstand mit Pronase in Konzentrationen von 0,05 bis 0,25 % bei 37°C im Schüttelinkubator (100 Osz./min) bis zu 60 min lang inkubiert. Dabei befanden sich 25 ml des Überstandes in einem 100 ml-Erlenmeyerkolen unter Carbogenatmosphäre. Nach 30 , 45 und 60 Minuten wurden Proben entnommen und in einer Neubauerkammer ausgezählt. Die Abnahme des Hepatozytenanteils an der Gesamtzellzahl zeigt Abbildung 1.

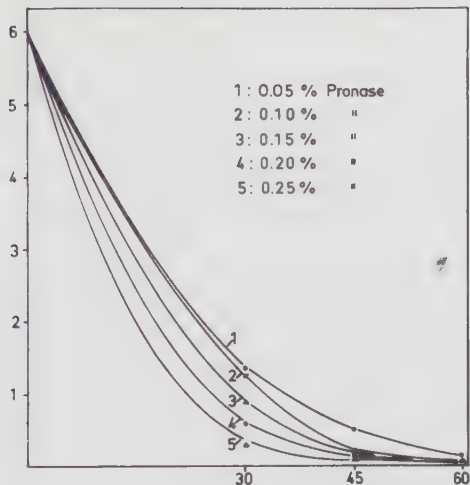


Abb. 1 : Inkubation des 1. Überstandes der Differentialzentrifugation mit 0,05 bis 0,25 % Pronase. Abszisse: Zeit in Minuten, Ordinate: Anteil der Hepatozyten an der gesamten Zellzahl.

Es stellte sich heraus, daß nach 45 Minuten Inkubationszeit die Hepatozyten schon durch 0,1 % Pronase fast vollständig zerstört worden waren, sie machten weniger als 0,2 % der Zellen aus. Die nächsthöhere Pronasekonzentration (0,15 %) ließ nach 45 Minuten nur 0,14 % Hepatozyten übrig, einen Wert, den WAGLE et al. (37) erst nach 90 minütiger Inkubation mit 0,25 % des Enzyms erreichten.

Versuche, den Zerfall der Hepatozyten durch höhere Schüttelfrequenz des Inkubators zu beschleunigen, hatten keinen Erfolg. Die mechanische Belastung, der die Zellen bei 100 Osz./min ausgesetzt waren, brauchte demnach nicht weiter erhöht zu werden.

Auch die Gesamtzahl der Sinusoidalzellen verringerte sich, wie Abb. 2 zeigt. Innerhalb der ersten 15 Minuten nahm die Zellzahl um etwa 30 % ab, um in der Folgezeit fast konstant zu bleiben.

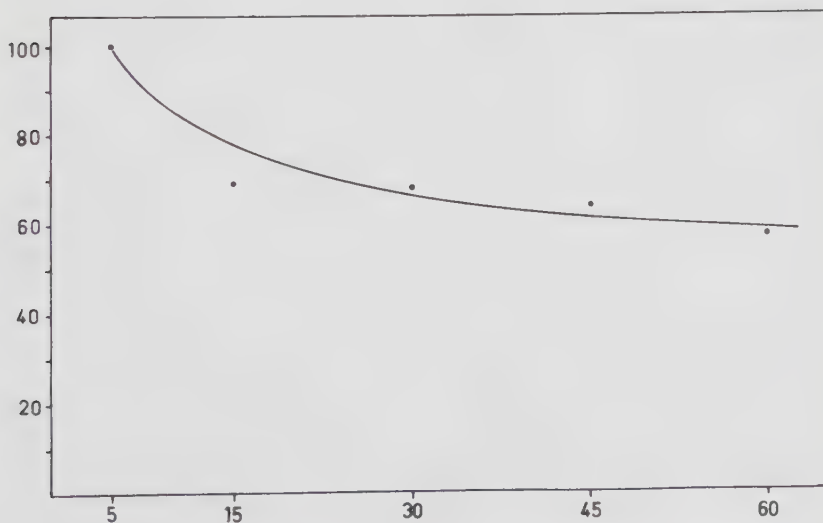


Abb. 2 : Abnahme der Zahl von Sinusoidalzellen während der Inkubation mit 0,15 % Pronase. Abszisse : Inkubationszeit (min), Ordinate : Anteil der verbliebenen Zellen, Zählung bei $t = 5 \text{ min} \hat{=}$ 100 % ($n = 4$).

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß nach Anreicherung der Sinusoidalzellen durch Zentrifugation eine nur 45 minütige Behandlung mit 0,15 % Pronase genügt, um Zellen mit weniger als 0,2 % Hepatozyten zu erhalten. Die durchschnittliche Ausbeute je 180 g Ratte betrug $139,5 \cdot 10^6$ Sinusoidalzellen. Dieser im Vergleich zu früheren Arbeiten niedrige Wert (37) wird zwanglos dadurch erklärt, daß etwa 20 % der Sinusoidalzellen mit den Überständen 2 und 3 verworfen worden sind. Die Gesamtzahl der Sinusoidalzellen betrug also ca. $174 \cdot 10^6$ je 180 g Ratte, was sehr gut mit WAGLEs Ausbeute von $179 \cdot 10^6$ Zellen übereinstimmt.

Der gesamte Arbeitsvorgang ist in Abb. 3 zusammengefasst.

1.1.2. Vitalitätskriterien für Hepatozyten

Die Beurteilung der Zellvitalität berücksichtigt neben der Morphologie mehrere Parameter, die der Aufrechterhaltung der Zellfunktion dienen. Diese lassen sich zusammenfassen unter zwei Gesichtspunkten:

1. Membranfunktionen im weitesten Sinne
2. Funktionen des Anabolismus und Katabolismus

Lichtmikroskopisch haben vitale Zellen scharf umrissene Konturen ohne Ausstülpungen des Zellinhalts, das Cytoplasma ist klar, der Zellkern deutlich erkennbar (38). Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Hepatozyten entsprachen diesen Anforderungen (Abb. 4).

Elektronenmikroskopisch gelten Schwellungen der Mitochondrien, Bildung cytoplasmatischer Vakuolen, Zerfall des Nucleolus und des Chromatins, ein ungeordnetes rauhes und glattes endoplasmatisches Retikulum und Golgiapparat sowie Auflösung der Zellmembran als Zeichen der Schädigung (19).

Funktionstests für die Zellmembran überprüfen ihre Eigenschaft, als selektiv wirkende Barriere zwischen Zellinnerem und der Umgebung zu dienen und Signale, die auf sie einwirken, empfangen und adäquat umsetzen zu können.

Eine funktionierende Zellmembran muß Substanzen, die im umgebenden Medium vorhanden sind, ausschließen können, beispielsweise Inulin (39), Trypanblau (19, 35, 39, 40) oder Intermediate des Tricarbonsäurecyclus (19, 39, 40). Andererseits muß sie verhindern, daß Zellinhaltsstoffe auslaufen. Als Indikatoren dafür dienten Enzyme aus verschiedenen Kompartimenten, wie LDH (Cytosol) (19, 39, 40), G1DH (Mitochondrien) (32) und

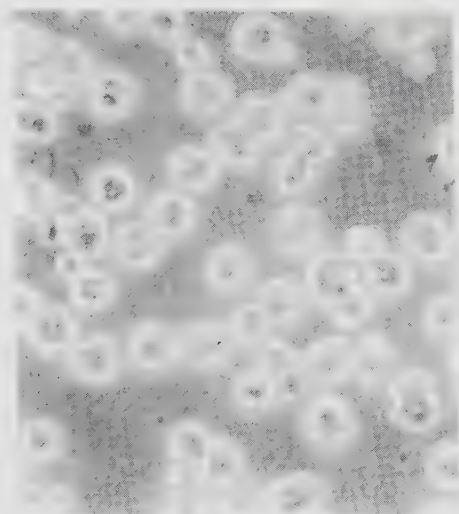


Abb. 4 : Frisch isolierte Hepatozyten (600 x vergr.)

GPT (19). Auch die Beibehaltung eines steilen Na^+ - und K^+ - Konzentrationsgradienten gilt als wesentliches Vitalitätskriterium (16, 18, 39, 40).

Die Kommunikationsfunktionen der Membran wurden mit Hilfe der von der Ganzleber her bekannten Antworten auf Hormonzugabe, von Insulin, Glucagon und Katechol - aminen, überprüft (4, 17, 38, 41, 47).

Eine vitale Leberzelle muß eine Reihe von Stoffwechsel - funktionen aufweisen, so eine ausreichende Sauerstoff - aufnahme (4, 16, 19, 39), einen angemessenen ATP - Spiegel und ein physiologisches ATP/ADP Verhältnis auf -

rechterhalten können (32, 39, 40), bestimmte Syntheseleistungen vollbringen, so die Gluconeogenese aus Lactat (42), Glycogensynthese (39), Albuminsynthese (43), Uridineinbau (32, 40) und Harnstoffbildung (18).

Als empfindlichste Kriterien gelten ein ⁴⁴ hohes Membranpotential von über 35 mV, hohe cytosolische Kalium - und niedrige Natriumkonzentration (40) sowie die ausbleibende Steigerung des O₂-Verbrauchs in Gegenwart von 1 mM Succinat.

Verhältnismässig unempfindliche Methoden sind der Ausschluß von Trypanblau oder der Austritt von Enzymen.

Die mit diesem Verfahren gewonnenen Hepatozyten sind in unserem Labor bezüglich ihrer Nucleotid-Spiegel und der Enzym Austritte bereits ausführlich charakterisiert worden, wobei gute Übereinstimmung mit in vivo gemessenen Werten gefunden wurde (32). Ergänzend dazu wurden die intrazellulären Na⁺- und K⁺- Konzentrationen bestimmt, ein Verfahren, das für die routinemässige Qualitätsüberprüfung jedoch zu aufwendig ist. Es wurde die Rekonstituierung der Konzentrationsgradienten zwischen Zellinnerem und Medium im Verlauf einer 80 minütigen Inkubation verfolgt.

In Anlehnung an BAUR et al. (40) und RIEBELING (44) wurden die Zellen mit Hilfe der sogenannten Zentrifugalfiltration vom Medium abgetrennt, und die Elektrolytkonzentrationen flammenphotometrisch bestimmt. Tabelle 2 gibt die Normalisierung der intrazellulären Na^+ - und K^+ -Konzentrationen wieder. Die Daten sind in guter Übereinstimmung mit den Werten von BAUR et al. (40) für Einzelzellen ($\text{Na}_i^+ = 47,3 \text{ mM}$, $\text{K}_i^+ = 117,7 \text{ mM}$) und von BARNABEI et al. (46) ($\text{K}_i^+ = 116,8 \text{ mM}$) und von SEGLEN (20) ($\text{K}_i^+ = 102,8 \text{ mM}$) sowie von WILLIAMS und WOODBURY (45) für die Ganzleber ($\text{Na}_i^+ = 22 \text{ mM}$, $\text{K}_i^+ = 165 \text{ mM}$).

Zeit (min)	Na_i^+ (mM)	K_i^+ (mM)
0	90,7	61,9
20	69,3	124,8
50	59,3	106,5
80	53,3	118,6

Tabelle 2 : Wiederherstellung der intrazellulären Na^+ - und K^+ -Konzentrationen von Hepatozyten nach der Präparation.

Zur schnellen Überprüfung der Zellqualität wurde das Aussehen im Phasenkontrastmikroskop beurteilt und der

Prozentsatz trypanblauaufnehmender Zellen (aus 0,25 % Trypanblau in 0,9 % NaCl) ermittelt. Im Durchschnitt schlossen 95 % der Zellen den Farbstoff aus.

1.1.3. Vitalitätskriterien für Sinusoidalzellen

Für die gut charakterisierten, empfindlichen Hepatozyten ist es einfach, eine ganze Reihe von Qualitätskriterien zu benennen. Die Sinusoidalzellen dagegen sind wesentlich weniger genau untersucht worden, sie können sich besser an extreme Lebensbedingungen anpassen (Sauerstoffmangel), so daß ein allgemein gültiger Maßstab ihrer Vitalität schwerer zu definieren ist.

Der Ausschluß von Trypanblau stellt kein verlässliches Merkmal dar (30, 47), er ist allenfalls als Schnelltest zur groben Orientierung geeignet

VAN BERKEL (47) konnte zeigen, daß einige lysosomale Enzyme, an denen die Sinusoidalzellen besonders reich sind, im Verlauf der Zellpräparation nicht verloren gehen. Er schließt daraus, daß die isolierten Zellen in diesem Punkt dem in vivo-Zustand entsprechen.

Unsere Versuche, auch in den Sinusoidalzellen intrazelluläre Elektrolytkonzentrationen zu messen, scheiterten, weil sich im Verlauf der Inkubation häufig Zellaggregate bildeten, wodurch die Zentrifugalfiltration gestört wurde.

Statt dessen wurde daher der Austritt je eines cytosolischen (LDH) und eines mitochondrialen (G1DH) Enzyms ins Inkubationsmedium gemessen. Die Werte zeigen (Tab. 3), daß trotz gleicher Zahl Trypanblau - aufnehmender Zellen der Enzymverlust aus schonender präparierten Zellen deutlich geringer war als in älteren Arbeiten (2). Die Zahlen geben den Prozentsatz der gesamten Enzymaktivität des Ansatzes an, der sich nach 20 min Inkubationszeit im Medium wiederfindet. Ausserdem werden in Tab. 3 einige allgemeine Daten von Sinusoidalzellen mit Werten anderer Autoren verglichen.

		(2)	(31)	(116)
µg DNA / 10 ⁶ Zellen	23,3 ± 10,4		8,4	9,9
mg DNA / g FG	38,0 ± 17,0			
mg DNA / g Protein	273 ± 100			
mg Protein / g FG	139 ± 64			
µg Protein / 10 ⁶ Z.	85,3 ± 39,3		65	141
Zellen / g FG (x 10 ⁻⁹)	1,63 ± 0,15			
ATP (nMol / g FG)	830 ± 200			
UTP (nMol / g FG)	148 ± 35			
Enzym - LDH (%)	19,9 ± 0,8	26,1 ± 4,4		
austritte:G1DH (%)	8,5 ± 0,9	11,3 ± 4,8		
Trypanblauaufnahme (%)	2	2	5	
Kohlephagozytose (%)	ca. 35			40

Tab. 3 : Charakterisierung von Sinusoidalzellen

Ein wichtiges Vitalitätskriterium wurde von den so gewonnenen Zellen allerdings nicht erfüllt : Die Fähigkeit, sich auf Gewebekulturgefäßen abzusiedeln und dort weiterzuleben. Es sei schon an dieser Stelle zusammenfassend gesagt, daß weder der Einsatz verschiedener Collagenasepräparate noch das Plattieren in unterschiedlichen Kulturmedien und Zellkonzentrationen oder der Gebrauch verschiedener Gefäßmaterialien die Zellen zum Festhaften zu bewegen vermochte.

1.2. Kultivierung von Hepatozyten

Auf der Suche nach einem längerfristig verwendbaren Lebermodell sind schon früh Versuche zur Kultivierung von Hepatozyten unternommen worden. Weil es aber keine Verfahren gab, die Zellen in genügend großer Ausbeute bei guter Vitalität zu isolieren, war man darauf angewiesen, daß sich die Zellen in Kultur teilten und vermehrten. Dies führte zum raschen Verlust spezifischer Leberfunktionen oder auch zum Überwuchern fremder Zellen (49 - 52), so daß die damit erhobenen Befunde nur in sehr begrenztem Umfang für das ursprüngliche Ge-

webe repräsentativ waren (Übersicht bei (52). Auch die Verwendung von Hepatomzellen (53) und Zellen aus fetalen Lebern (54) stellt nur ein Modell dar, das mit der reifen, ausdifferenzierten Leber in einigen, nicht aber in allen Punkten vergleichbar ist (54 - 56).

Man ist daher dazu übergegangen, frisch gewonnene Hepatozyten in nicht proliferierender Kultur zu halten, um die ursprünglichen Eigenschaften der Zellen während ihrer Überlebenszeit zu bewahren. Und da seit Einführung der enzymatischen Einzelzellpräparation aus einer Leber große Mengen vitaler Zellen zugänglich geworden sind, gibt es eine Reihe gut untersuchter Eigenschaften dieser Kulturen.

Die wesentlichen methodischen Ansätze bestehen in der Verwendung von Zellen aus regenerierender Rattenleber nach Teilhepatektomie (57, 58) oder aus normaler Leber. Die Zellen wurden sowohl nach HOWARD et al. (60) als auch nach BERRY und FRIEND isoliert (59). Messungen mit Zellen aus regenerierender Leber sind allerdings mit Zurückhaltung zu bewerten, da diese auch Eigenschaften fetaler Leber aufweist (56).

In der vorliegenden Arbeit wurde auf den Ansatz von BERRY und FRIEND zurückgegangen. Die hohe Ausbeute an Zellen liefert nicht nur genügend Material für die Ver-

suche, sie macht es auch unwahrscheinlich, daß im Verlauf der Präparation eine bestimmte Zellpopulation angereichert wird. Diese Möglichkeit besteht durchaus, da in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, daß die Hepatozyten metabolisch keine einheitliche Zellklasse darstellen (61).

Das für die unsterile Hepatozytenbereitung verwendete Verfahren konnte mit einigen Modifikationen übernommen werden (s. Experimenteller Teil). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Hepatozytensediment in Medium TC 199 mit 10 % fetalem Kälberserum (in der Folge "Kulturmedium" genannt) resuspendiert. Medium TC 199, das kein Minimalmedium ist, wurde gewählt, um mit den Kupferzellkulturen vergleichbare Bedingungen zu haben. Die Zellkonzentration wurde auf etwa 10 mg / ml eingestellt. Vorversuche hatte gezeigt, daß bei Einsaat von 3 ml dieser Suspension auf eine 60 mm Gewebekulturplatte sich ein fast geschlossener Monolayer ausbildete. War die Zelldichte größer, so fanden sich trotz sorgfältiger Verteilung des Inokulums auf der Platte immer Bereiche, in denen die Zellen mehrschichtig übereinander lagen. Dies führte in kurzer Zeit zum Absterben des betreffenden Bezirks.

Auch im Verlauf der weiteren Kultivation sollte eine 60 mm Platte mit 3 ml Kulturmedium beschickt werden.

Bei wesentlicher Unterschreitung dieser Menge war die Pufferkapazität zu früh erschöpft, und die Konzentration von Stoffwechselprodukten nahm zu rasch zu.

Bei zu großem Volumen scheint dagegen die Diffusionsstrecke für den Gasaustausch zu lang zu sein, wie es auch bei (57) vermutet wurde. In beiden Fällen war die Lebensdauer der Kultur deutlich niedriger.

Nach drei Stunden hatten sich die Hepatozyten schon so fest auf dem Plattengrund abgesetzt, daß mit einem Medienwechsel tote, nicht abgesiedelte Zellen und Zelltrümmer entfernt werden konnten. Danach wurde das Medium alle 24 Stunden gewechselt.

Bemerkenswert waren die morphologischen Veränderungen der Kultur im Laufe der ersten 24 Stunden (Abb. 5 bis 8). Zur Zeit der Aussaat lagen die Zellen deutlich getrennt voneinander als kleine Kugeln auf dem Plattenboden. Schon im Verlauf der ersten vier Stunden begann sich eine Anordnung zu Zellketten abzuzeichnen, die Hepatozyten wurden flacher und verloren langsam ihre Kugelform. Nach acht Stunden hatten sich regelrechte Trabekel gebildet, die Zellen erschienen miteinander und mit dem Plattenboden verwachsen zu sein, hatten endgültig ihre Kugelgestalt verloren und waren zu flachen, polygonalen Gebilden geworden.

Im Verlauf der ersten 24 Stunden hatte sich ein zusammenhängender Zellrasen gebildet, die wenigen granu -

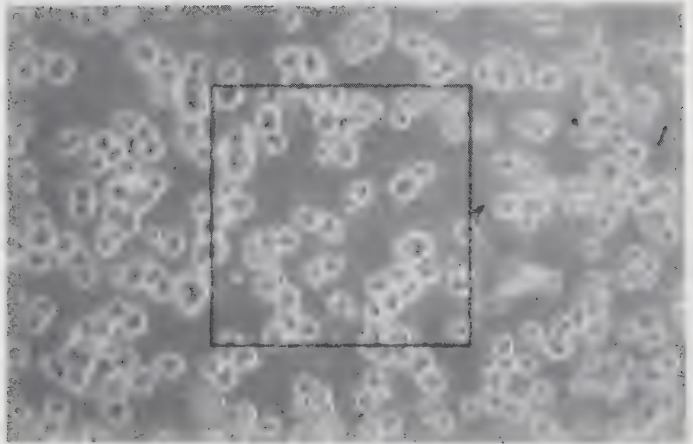


Abb. 5 : Hepatozyten, 4 h in Kultur, Phasenkontrast
Seitenlänge des Quadrats $\hat{=}$ 0,25 mm

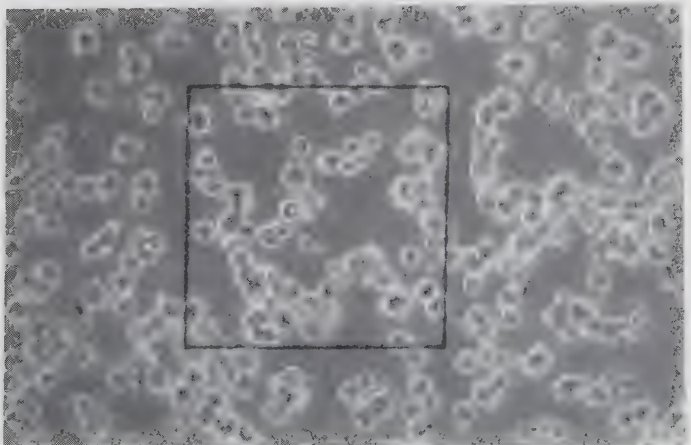


Abb. 6 : Hepatozyten, 8 h in Kultur, Phasenkontrast
Seitenlänge des Quadrats $\hat{=}$ 0,25 mm

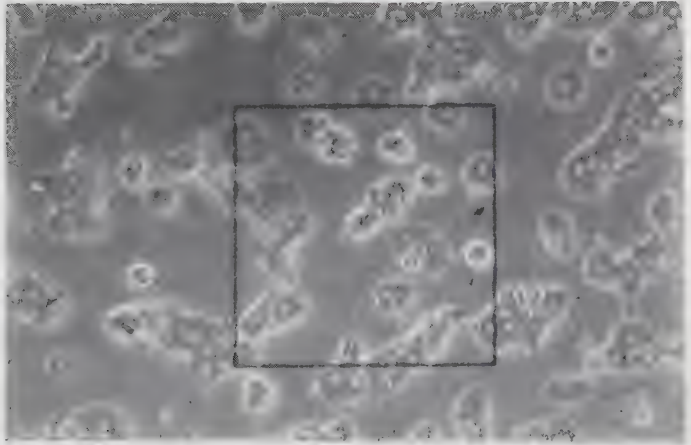


Abb. 7 : Hepatozyten, 48 h in Kultur, Phasenkontrast
Seitenlänge des Quadrats $\hat{=}$ 0,25 mm

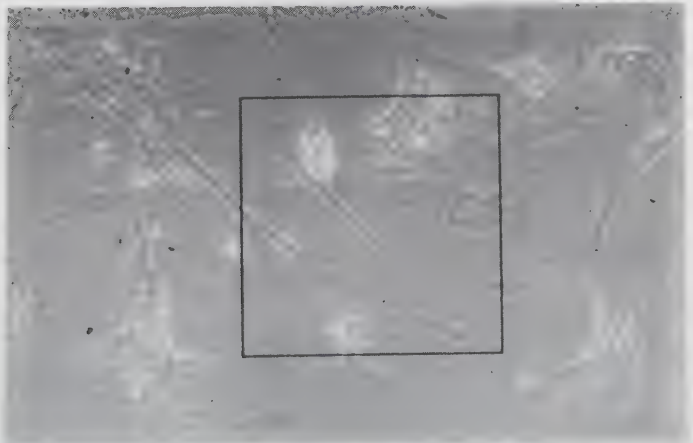


Abb. 8 : Hepatozyten, 7 Tage in Kultur, Phasenkontrast
Seitenlänge des Quadrats $\hat{=}$ 0,25 mm

lierten, toten Zellen wurden mit dem nächsten Medienwechsel entfernt. Bis zum dritten Tag änderte sich das Bild nicht wesentlich, die Zellen wurden noch flacher, breiteten sich noch weiter aus. Während der folgenden Tage begannen immer mehr Zellen, sich von der Platte abzulösen, es traten Kolonien ~~fibroblas-~~tenähnlicher Zellen auf. Nach 10 Tagen waren nur noch wenige Inseln mit der typischen Struktur von Hepatozyten übriggeblieben.

1.2.1 Vitalität der Hepatozytenkulturen

Die bei der Kultivierung von Hepatozyten angelegten Qualitätsmaßstäbe erfassen Leistungen der gesamten Zelle und die schon früher besprochenen Parameter für die Stabilität der Membran und die Funktion bestimmter Stoffwechselwege.

Als Leistung der gesamten Zelle wurde ihre Fähigkeit angesehen, sich auf dem Boden der Kulturgefäße festzusetzen und damit zu verwachsen. Beim ersten Medienwechsel drei Stunden nach der Aussaat konnten bei einem mittleren aufgetragenen Feuchtgewicht von 11,8mg je 60 mm Platte nur $0,22 \pm 0,09$ mg ($\hat{=} 2,1 \pm 1 \%$) Zellmaterial wieder entfernt werden. Die auf der Platte verbliebenen Zellen verwuchsen so gut mit der Un-

terlage, daß auch nach 24 und 48 Stunden beim Medienwechsel stets weniger als 1 % des ursprünglichen Feuchtgewichts entfernt wurden.

Ein deutlicher Zusammenhang bestand zwischen der Zahl Trypanblau aufnehmender Zellen in der frischen Präparation und dem Anteil nicht festhaftender Zellen. Es setzten sich jedoch stets mehr Zellen ab, als nach dem Resultat des Trypanblautests zu erwarten gewesen wäre. Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, daß Reparaturmechanismen für die Zellmembran existieren, wie sie auf Grund elektronenmikroskopischer Befunde auch von DROCHMANS et al. (35) angenommen worden sind.

Die Verunreinigung mit Sinusoidalzellen wurde mikroskopisch überprüft, wegen des großen Überschusses an Hepatozyten war die Auszählung nicht einfach. Der Anteil lag jedoch sicher unter einem Prozent. Auch der Versuch, noch vorhandene Kupfferzellen durch Phagozytose von Kohle besser sichtbar zu machen, brachte dasselbe Ergebnis.

Die Fähigkeit der Zellmembranen, Trypanblau auszuschliessen, wurde überprüft (Abb. 9). Hierbei zeigte sich, daß neben den wenigen vorhandenen granulierten, also abgestorbenen Zellen auch äußerlich unversehrt erscheinende Exemplare den Farbstoff in mehr oder weniger starkem Ausmaß aufnahmen. Ihr Anteil blieb je-

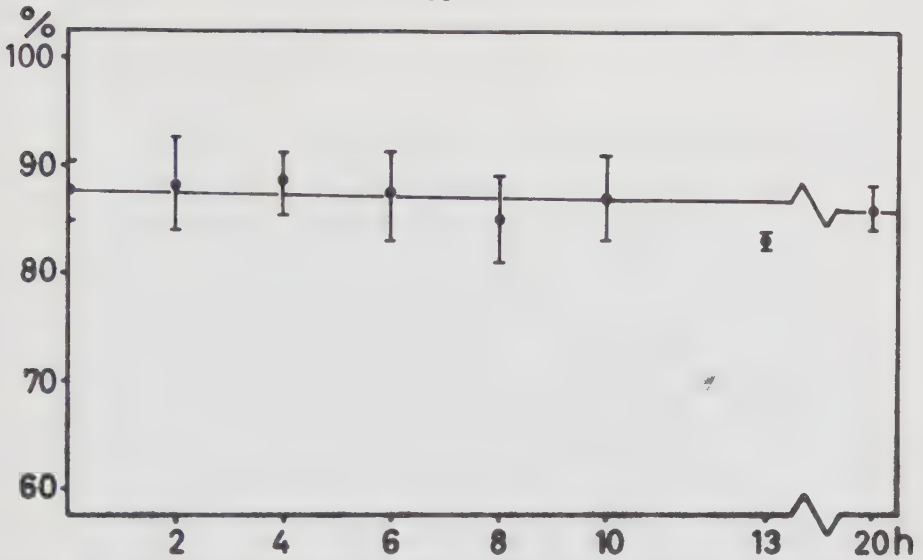


Abb. 9 : Hepatozytenkultur, 24 Stunden nach Aussaat: Entwicklung des Anteils trypanblaunegativer Zellen über die folgenden 20 Stunden.

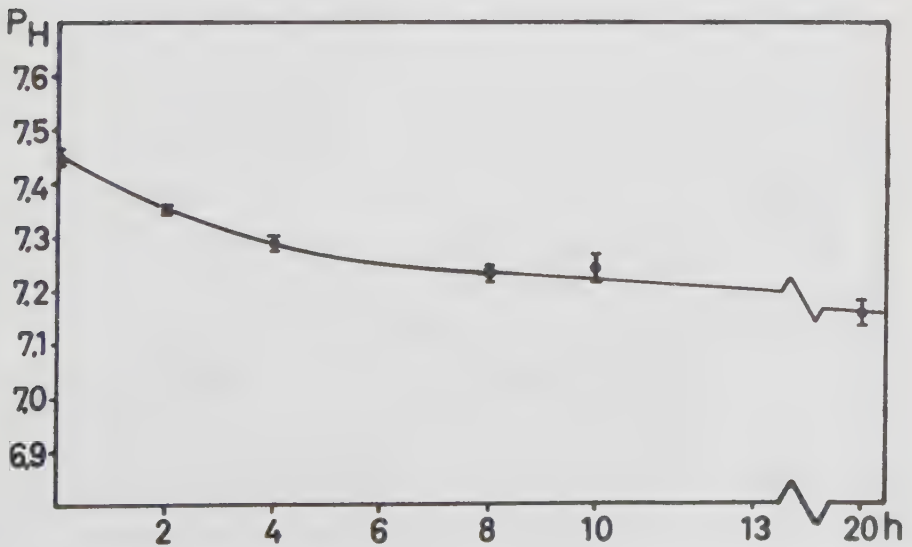


Abb. 10 : Hepatozytenkultur wie in Abb. 9, p_H - Wert des Mediums.

doch über den Zeitraum, in dem die Experimente durchgeführt wurden, fast konstant. Die leichte Zunahme läßt sich neben dem normalen Alterungsprozeß auch durch das Absinken des p_H -Wertes im Kulturmedium erklären. Nach Beobachtungen von BAUR et al. (40) nimmt mit fallendem p_H -Wert der Anteil farbstoffaufnehmender Zellen stark zu. Dieser Vorgang ist durch Anheben des p_H -Wertes umkehrbar.

Abb. 10 zeigt das langsame Absinken des p_H -Wertes, wobei die Pufferungskapazität des Mediums ausreicht, ihn im Verlauf von 20 Stunden um nicht mehr als 0,3 Einheiten abnehmen zu lassen.

Die Kulturen waren in den betreffenden Zeiträumen auch in der Lage, die intrazellulären Gehalte an ATP, UTP, UDPG und Σ UMP aufrechtzuerhalten (Tabelle 4). Auch die Bildungsrate von Harnstoff blieb konstant (Abb. 11). Die stärkeren Schwankungen zu Beginn der Messungen sind wohl darauf zurückzuführen, daß nach dem Aufbringen frischen Mediums auf die Platten noch in den Zellen vorhandener Harnstoff ausströmt und so eine höhere Bildungsrate vortäuscht. Die Messungen wurden mit serumfreiem Medium vorgenommen, um die zur Enteiweißung nötigen Arbeitsschritte einzusparen.

Durch Einbauversuche mit 3H -Thymidin konnte gezeigt werden, daß die Hepatozyten im Verlauf von 72 Stun -

$\frac{\mu\text{Mol}}{\text{g} \times \text{h}}$

- 30 -

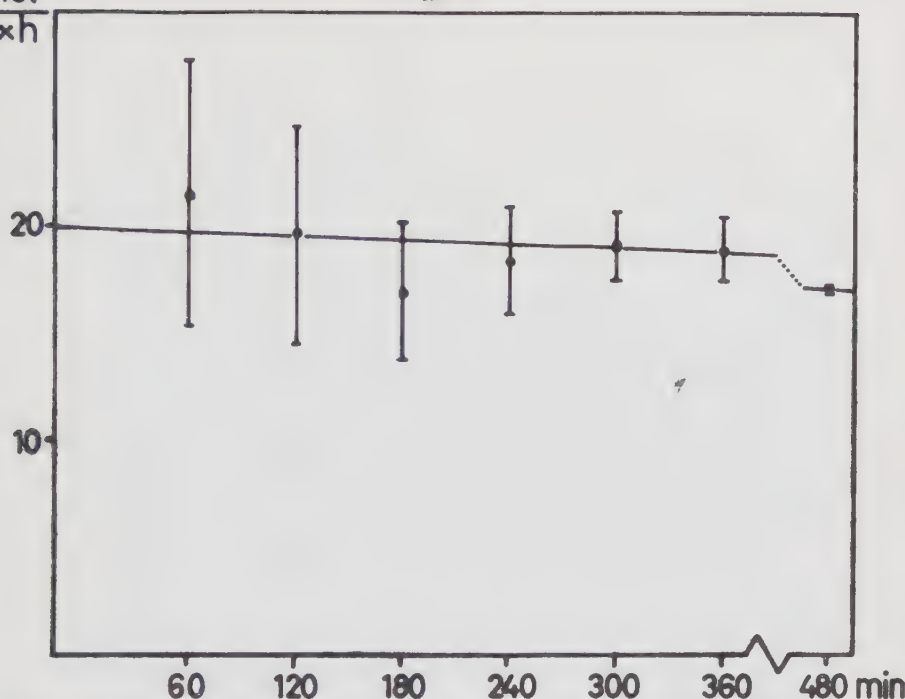


Abb. 11 : Hepatozytenkultur, 24 Stunden nach Aussaat. Harnstoffbildung (in $\mu\text{Mol}/\text{g}(\text{FG}) \cdot \text{h}$) im Verlauf von 480 Minuten. Medium: TC 199.

Tabelle 4 : Hepatozytenkultur, 24 Stunden nach Aussaat. Gehalte an Nucleotiden im Verlauf von 10 Stunden. ($\mu\text{Mol}/\text{g FG}$)

t (h)	ATP	UTP	UDPG	ΣU
0	$2,9 \pm 0,6$	$0,20 \pm 0,04$	$0,30 \pm 0,06$	$1,5 \pm 0,4$
2	$3,7 \pm 0,5$	$0,15 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,06$	$1,3 \pm 0,3$
4	$3,0 \pm 0,0$	$0,19 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,11$	$1,4 \pm 0,4$
6	$2,4 \pm 0,2$	$0,18 \pm 0,0$	$0,17 \pm 0,06$	$1,5 \pm 0,1$
8	$3,2 \pm 0,4$	$0,19 \pm 0,08$	$0,13 \pm 0,04$	$1,3 \pm 0,3$
10	$3,0 \pm 1,1$	$0,21 \pm 0,06$	$0,11 \pm 0,06$	$1,3 \pm 0,6$

den die DNA - Synthese nicht steigern, und zwar weder in serumhaltigem noch in serumfreiem Medium. In Übereinstimmung damit wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop fast nie Mitosefiguren gesehen. Es bestand also kein Grund zu der Annahme, daß die Zellen wegen gesteigerter Teilungsaktivität Gefahr liefen, durch Entdifferenzierung ihre ursprünglichen Eigenschaften zu verlieren. Auch HIRSIGER et al. (58) fanden in Kulturen normaler Rattenleberzellen einen Mitoseindex von weniger als 1 Prozent.

Mikroskopisch wurde vor jedem Versuch geprüft, ob die Kulturen morphologisch einwandfrei waren, das heißt, die Zellen mußten ein klares, nicht granuliertes Cytoplasma aufweisen, keine Ausstülpungen der Plasmamembran zeigen und gut mit der Unterlage verwachsen sein. Da mit dem Phasenkontrastmikroskop gearbeitet wurde, konnten auch sehr niedrige bakterielle Kontaminationen rechtzeitig erkannt und die betreffenden Platten verworfen werden. Das war nach anfänglichen Störungen nur noch sehr selten nötig.

1.3. Kultivierung von Kupfferzellen

Schon beim ersten Versuch, Kupfferzellen zu isolieren, wurde auch an die Kultivierung dieser Zellen gedacht (24). Dann wurde lange Zeit auf diesem Gebiet nichts unternommen. In jüngerer Zeit versuchten als erste VON KRÄMER-BRYN und OFTEBRO (62) Kupfferzellen aus zerquetschten Rattenlebern in Kultur zu bringen. Dieser Weg brachte jedoch nur sehr geringe Ausbeuten und war mit sehr aggressiven mechanischen Methoden belastet.

In der Folgezeit wurden mehrere enzymatische Methoden zur Gewinnung von kultivierbaren Kupfferzellen beschrieben. MELLY et al. (63) rührten kleingeschnittene Kaninchenleber mit Pronaselösung. Aus einem 3 kg schweren Tier erhielten sie 200 bis 800 Millionen Zellen, von denen sich allerdings nach 18 Stunden nur etwa 250 000 auf den Kulturgefäßen abgesetzt hatten. MUNTHE KAAS et al. (64) arbeiteten mit der Kombination aus Collagenase-Perfusion und anschliessender Pronasebehandlung der Leberzellsuspension.

In der vorliegenden Arbeit wurde ursprünglich versucht, die bei der gemeinsamen Isolierung neben den Hepatozyten anfallenden Sinusoidalzellen in Kultur zu bringen. Wie auf S. 20 schon kurz erwähnt, gelang es jedoch nicht, diese Zellen zum Festhaften auf Gewebekulturge-

fäßen zu bewegen. Die folgende Liste gibt die Parameter wieder, die variiert wurden, ohne daß sich nennenswerte Mengen von Zellen auf den Platten abgesiedelt hätten.

1. Collagenasepräparate von unterschiedlicher Aktivität und von verschiedenen Lieferanten (Worthington Biochemicals Corp. und Serva GmbH)
2. Pronase von Calbiochem in Konzentrationen von 0,05 bis 0,25 %.
3. Kulturmedien : MEM, BME, TC 199
4. Seren vom fetalen Kalb, vom neugeborenen Kalb, von der Ratte in Konzentrationen von 0,0 bis 50 %.
5. Kulturgefäße aus Glas, Celluloseacetatfolie (Biofolie Heraeus), Polystyrol-Petrischalen verschiedener Hersteller (Falcon, Greiner), auch mit Collagen aus Rattenschwänzen beschichtet.
6. Zellzahlen von 1,2 bis $6,8 \cdot 10^6$ je 60 mm Platte
7. Inokula von 2 bis 4 ml je 60 mm Platte
8. Medienwechsel mit Entfernung von Zelltrümmern und nicht abgesiedelten Zellen nach 2 bis 48 Stunden oder auch Verzicht auf Medienwechsel und Kontrolle der Kultur über 10 Tage.
9. Variation des CO_2 -Gehalts der Gasphase im Inkubator zwischen 3 und 10 %.

10. Kultivierung des ersten Überstandes der Differentialzentrifugation ohne vorherige Entfernung der Hepatozyten durch Pronase.

Es wurde nun, besonders als Schlußfolgerung aus Punkt 10, die Annahme fallengelassen. das sehr unspezifisch wirkende Proteasengemisch "Pronase" sei ⁴schuld am Nichtabsiedeln der Zellen gewesen. In Anlehnung an MELLY et al. (63) und KNOOK et al. (26) wurden die Sinusoidalzellen ohne Einsatz von Pronase isoliert:

In die mit EGTA-haltigem Medium blutfrei gespülte Leber wurde Pronaselösung injiziert. Das Organ begann daraufhin zu zerfallen, wurde noch mechanisch zerkleinert und mit Pronaselösung gerührt (s. Experimenteller Teil). Nach dieser recht groben Behandlung enthielten die verbliebenen Sinusoidalzellen nur noch äusserst wenige , meist Trypanblau-aufnehmende Hepatozyten.

Tabelle 5 enthält Daten über die Ausbeute an Sinusoidalzellen, über die Verunreinigung mit Hepatozyten sowie über das Phagozytoseverhalten. Es verwundert nicht, daß nach der aggressiven mechanischen Behandlung die Zahl Trypanblau-aufnehmender Zellen größer ist als in den schonend präparierten Zellen. Es zeigte sich auch, daß die Zellausbeute großen Schwankungen unterworfen war. Sie war sowohl vom verwendeten Rattenstamm als auch von Alter und Gewicht der Tiere abhängig.

Sinusoidalzellen / 100 g Ratte	$60,4 \pm 23,0 \cdot 10^6$	(26)
Trypanblau-aufnehmende Z. (%)	$5,3 \pm 2,6$	(26)
Kohlephagozytierend (%)	$37,6 \pm 1,1$	(4)
Latexphagozytierend (%)	$11,6 \pm 3,1$	(9)
Hepatozyten (%)	$0,13 \pm 0,07$	(9)
$\mu\text{g Protein} / 10^6 \text{ Zellen}$	56,1	(3)
$\mu\text{g DNA} / 10^6 \text{ Zellen}$	5,6	(3)

Tabelle 5 : Ausbeute an Sinusoidalzellen (bezogen auf 100 g Rattenleibengewicht) und charakteristische Befunde der Präparation. Zahl der unabhängigen Bestimmungen in Klammern.

So lieferten Wistar-Ratten stets bessere Ausbeuten als BD II-Ratten. Auch MUNTHER-KAAS (65) erhielt von jungen, leichten Tieren fast 50 % bessere Ausbeuten, als von älteren Ratten, jeweils bezogen auf 100 g Körpergewicht.

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Sinusoidalzellen in Medium TC 199 mit 30 % fetalem Kälberserum resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde so eingestellt, daß 0,6 bis $2,0 \cdot 10^6$ Zellen je cm^2 Plattenfläche eingesät werden konnten. Dabei erhielt eine 60 mm Platte 3 ml Zellsuspension, die anderen Plattenformate entsprechend mehr oder weniger. Auf den Kultur-

gefäßen siedelten sich die Kupfferzellen in guter Ausbeute ab, die Endothelzellen und andere blieben im Überstand, wie mit Hilfe des Phagozytoseverhaltens gezeigt werden konnte.

Der günstigste Zeitpunkt für den ersten Medienwechsel und das geeignetste Gefäßmaterial wurden in Vorversuchen ermittelt (Abb. 12). Auf Glasplättchen, (Deckgläser zum Mikroskopieren), die auf den Boden von Polystyrol-Petrischalen gelegt worden waren, siedelten sich die Zellen zwar schneller ab als auf Polystyrolflächen, insgesamt jedoch blieb die erzielte Zelldichte geringer. Als bester Zeitpunkt zum Entfernen der nicht abgesiedelten Zellen bei größter Ausbeute von Kupfferzellen erwies sich die Zeit zwischen 20 und 24 Stunden nach der Aussaat. Vor dem Aufbringen neuen Mediums wurden die Platten noch zweimal mit serumfreiem Medium gespült, um noch vorhandene Zelltrümmer und lose Zellen zu entfernen.

Aus dem beim ersten Medienwechsel entfernten Überstand siedelten sich bei erneuter Aussaat keine nennenswerten Zellmengen auf den Kulturgefäßen ab, es war also die bestmögliche Zellausbeute erreicht worden.

48 Stunden nach der Aussaat wurden an den Kulturen die Ausbeute und Reinheit der Zellpopulation bestimmt; die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

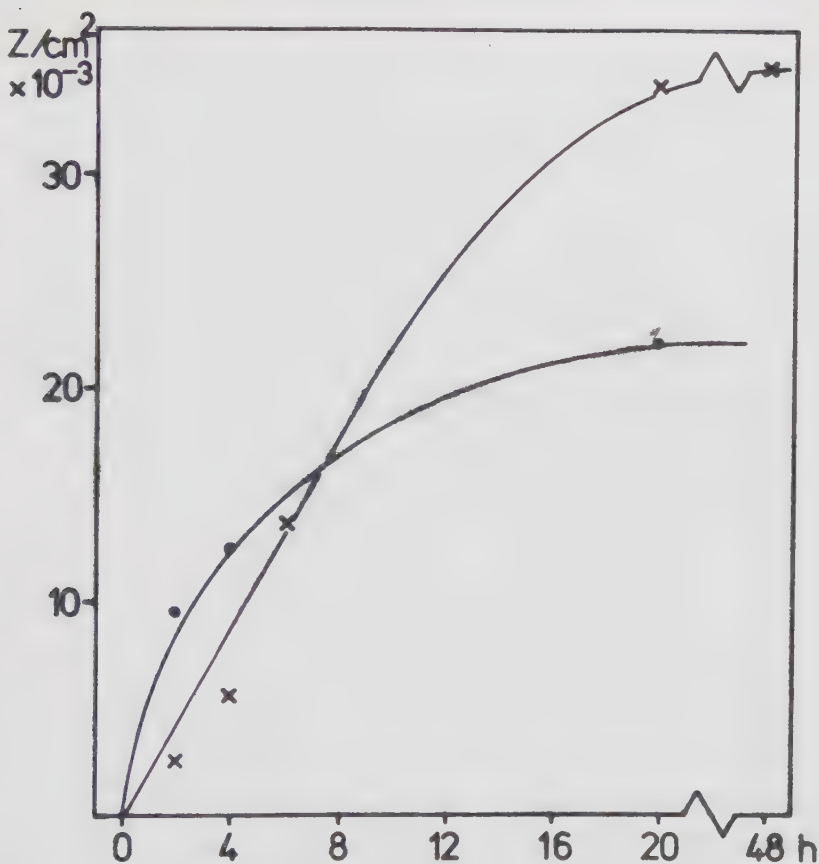


Abb. 12 : Einfluß vom Zeitpunkt des ersten Medienwechsels nach der Aussaat und vom Material der Kulturgefäße auf die Zahl abgesiedelter Kupfferzellen. Abszisse : Zeitpunkt des ersten Medienwechsels nach der Aussaat in Stunden. Ordinate : Zahl der abgesiedelten Zellen je cm^2 . $\times \hat{=}$ Polystyrolfläche, $\bullet \hat{=}$ Glasfläche

Ausbeute je 100 g Körpergewicht	$3,68 \pm 2,3 \cdot 10^6$
Kohlephagozytierend (%)	$96,9 \pm 0,8$
Latexphagozytierend (%)	$93,2 \pm 3,3$
Peroxidasepositiv (%)	92,9
$\mu\text{g Protein} / 10^6 \text{ Zellen}$	171 ± 34
$\mu\text{g DNA} / 10^6 \text{ Zellen}$	$5,0 \pm 0,5$

Tabelle 6 : Ausbeute und Reinheit der Kupfferzell -
kulturen, bestimmt nach 48 Stunden Kul-
tivationszeit.

Mikroskopisch waren in frisch ausgesäten Zellen fast nie Hepatozyten zu sehen, dafür aber noch Zelltrümmer und Erythrozyten. Diese hafteten oft an den bereits abgesiedelten Zellen. Innerhalb der ersten 48 Stunden wurden diese Partikel phagozytiert und abgebaut. Auf den Abb. 13 bis 15 läßt sich dieser Vorgang gut verfolgen. Nach dieser Zeit war das Zellinnere fast frei von den aufgenommenen Teilchen, die Zellen nahmen je nach Dichte der Besiedlung sogar eine "Stern"-form an. Die Kulturen wurden bis zu einer Woche beobachtet, ohne daß sich wesentliche morphologische Änderungen oder ein Überwachsen fremder Zellen gezeigt hätte (Abb. 16). Das typische Aussehen nach Kohlephagozytose gibt die Abb. 17 wieder.

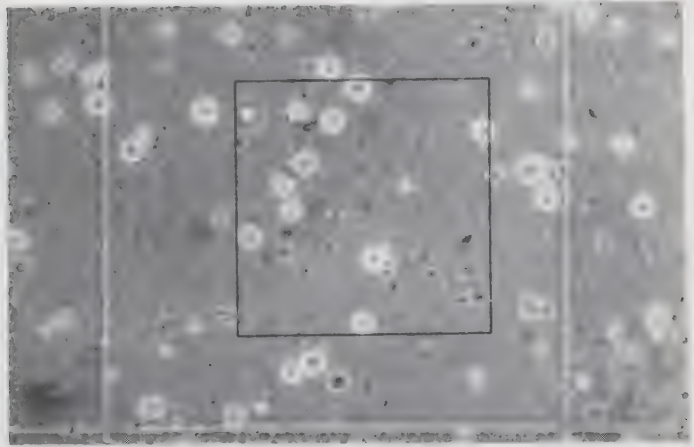


Abb. 13 : Sinusoidalzellen, frisch präpariert, in 0,25 %
Trypanblau. Phasenkontrast, 750 x vergr.

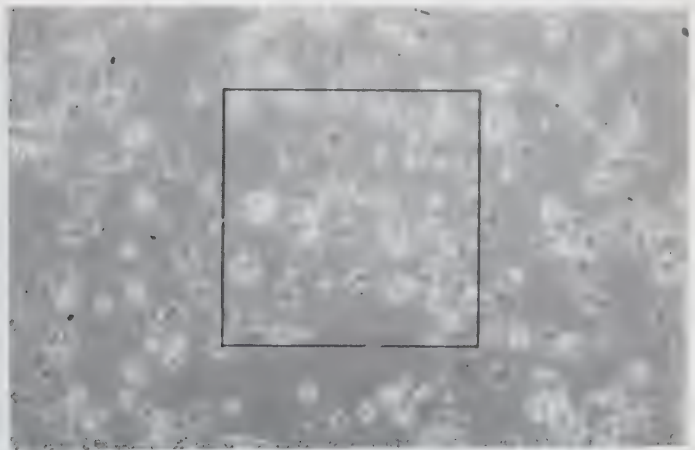


Abb. 14 : Kupferzellen, 24 h in Kultur, Phasenkontrast
Seitenlänge des Quadrats $\hat{=}$ 0,16 mm

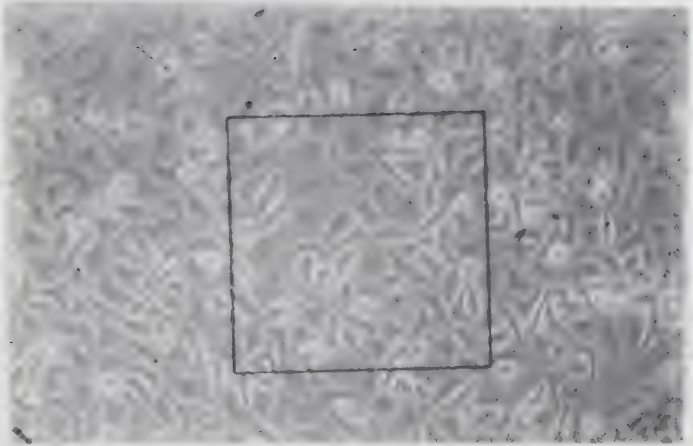


Abb. 15 : Kupferzellen, 72 h in Kultur, Phasenkontrast
Seitenlänge des Quadrats $\hat{=}$ 0,16 mm

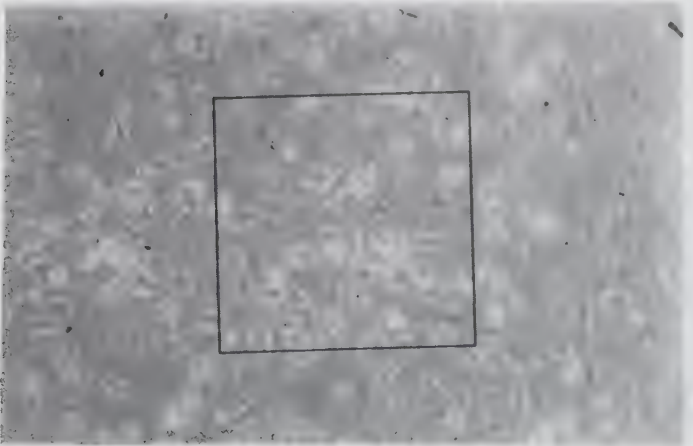


Abb. 16 : Kupferzellen, 1 Woche in Kultur, Phasen -
kontrast. Seitenlänge des Quadrats $\hat{=}$ 0,16 mm

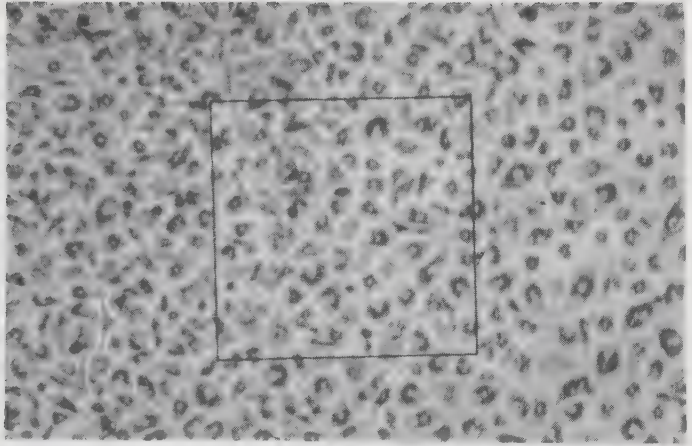


Abb. 17 a : Kupferzellen, 72 h in Kultur, nach 4 h
Kohlephagozytose. Hellfeld, Seitenlänge
des Quadrats $\hat{=}$ 0,16 mm

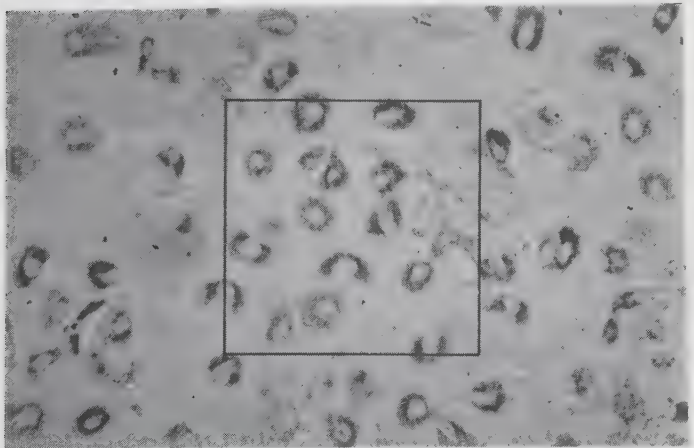


Abb. 17 b : Kupferzellen, 120 h in Kultur, nach 4 h
Kohlephagozytose, Hellfeld, Seitenlänge
des Quadrats $\hat{=}$ 0,10 mm

1.4. Kultivierung und Charakterisierung von Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen wurden aus Kaninchenlungen gewonnen. Zur Aktivierung der Zellen wurde den Tieren nach (66) eine Emulsion von FREUNDS Adjuvans (67) und 0,9 % Kochsalzlösung in die Ohrvene gespritzt. Die Präparation der Zellen erfolgte nach MYRVIK et al. (68).

Die frische Zellsuspension enthielt ausser den Makrophagen noch wechselnde Mengen von Erythrozyten, Leukozyten, Epitheloidzellen und Zellen des respiratorischen Epithels. Letztere waren deutlich an den sich bewegendenden Kinozilien zu erkennen. Tabelle 7 gibt einige charakteristische Befunde wieder.

Auf den Kulturgefäßen setzten sich jedoch nur die Alveolarmakrophagen fest, so daß die Kultivation wie bei den Kupfferzellen einen wirksamen Reinigungsschritt darstellte. In den erhaltenen Kulturen phagozytierten über 99 % der Zellen Kohle- und Latexpartikel. Alle anderen Zellen wurden beim Medienwechsel mit entfernt.

Aus technischen Gründen konnten die Zellen nicht unter vollkommen sterilen Bedingungen dargestellt werden. In den meisten Fällen blieben die Kulturen jedoch tagelang steril, ein eindrucksvoller Beweis für die gründliche Arbeit der Makrophagen.

	aktivierte Alv.-Makr.	nichtaktiv. Alv.-Makr.
Zellen je kg Körpergewicht ($\times 10^6$)	$137,8 \pm 34,6$	$39,6 \pm 27,0$
Zellzahl/g FG ($\times 10^9$)	$0,566 \pm 0,116$	$0,577 \pm 0,066$
Trypanblauaufnahme (%)	$5,6 \pm 2,3$	$3,7 \pm 1,3$
DNA (mg / g FG)	$2,7 \pm 0,5$	$0,78 \pm 0,02$
Protein (mg / g FG)	61 ± 9	37 ± 13
ATP (μ Mol / g FG)	$0,439 \pm 0,313$	$1,47 \pm 0,07$
UTP (μ Mol / g FG)	$0,156 \pm 0,066$	
Kontamination mit anderen Zellen (%)	$31,8 \pm 19,8$	$3,2 \pm 3,1$

Tabelle 7 : Charakterisierung von aktivierten und nicht-aktivierten Alveolarmakrophagen aus 2,5 bis 3,5 kg schweren Kaninchen (n = 6)

	aktivierte Alv.Makr.	nichtaktiv. Alv.-Makr.
Absiedelungsrate (%)	$58,5 \pm 13,7$	$81,1 \pm 5,5$
Kohlephagozytierend (%)	> 99	> 99
Latexphagozytierend (%)	> 99	> 99

Tabelle 8 : Charakterisierung der Alveolarmakrophagen in Kultur, 4 Stunden nach der Einsaat.

Bemerkenswert war auch, daß Ratten und Kaninchen die gleiche Ausbeute nichtaktivierter Alveolarmakrophagen bezogen auf das Körpergewicht lieferten. Aus Kaninchen wurden $3,96 \cdot 10^6$ Zellen je 100 Gramm Körpergewicht erhalten, die Spülung von Rattenlungen ergab $3,60 \cdot 10^6$ Zellen .

44

2. Bindung und Abbau von Peptidhormonen

Schon seit längerer Zeit werden die Interaktionen von Insulin und Glucagon mit verschiedenen Zellarten untersucht. Besonders interessierte dabei die Rolle der Leber, da sie nicht nur das wichtigste Zielorgan dieser Hormone ist, sondern auch maßgeblich an der Steuerung ihrer Blutspiegel beteiligt ist (68 - 69).

Neben in vivo-Studien wurden Untersuchungen mit der isoliert perfundierten Leber (70 - 72), mit isolierten Hepatozyten (73 - 75) und vor allem mit Leberzell - Plasmamembranen (76 - 78) angestellt. Stets standen dabei die Hepatozyten im Mittelpunkt des Interesses, nur wenige Erkenntnisse liegen über den Besatz der Nichtparenchymzellen mit Hormonrezeptoren vor und über ihren Beitrag zum Abbau der Hormone (79 - 81).

Hingegen wurden die Insulinrezeptoren von Fettzellen (82), Monozyten (83) und Lymphozyten (84) genauer untersucht, auch über einige andere Zellen wie Granulozyten (85), Makrophagen der Milz (86) und verschiedene Tumorzellen (87) liegen Berichte vor. Über Glucagon-Rezeptoren auf anderen als auf Leberzellen wurde noch nicht gearbeitet.

Während sich die meisten Untersuchungen an Leberzellen entweder auf solche im intakten Organ oder auf frisch

bereitete Einzelzellen oder auf Membranpräparationen bezogen, boten die in dieser Arbeit angelegten Kulturen eine Reihe verbesserter Arbeitsmöglichkeiten an:

1. Die beiden wichtigsten Zellarten der Leber stehen getrennt in reiner Form zur Verfügung
2. Die Zellen haben Zeit, ihre von der enzymatischen Präparation angegriffenen Membranstrukturen zu reparieren
3. Zellen ein und desselben Organs lassen sich über mehrere Tage hinweg beobachten
4. Die Messungen können unter Bedingungen stattfinden, die den physiologischen Verhältnissen sehr nahe kommen
5. Vergleichende Messungen mit anderen kultivierbaren Zellen werden möglich

Es ist bekannt, daß Behandlung mit proteolytischen Enzymen die Rezeptorendichte von Zellen vermindert (88 - 89). Wenn Zellen nach enzymatischer Präparation in der Lage sind, die Schäden zu beheben, dann sind an ihnen in Kultur nach einiger Zeit wieder höhere Rezeptordichten zu erwarten, als unmittelbar nach der Präparation.

Vom Insulin ist bekannt, daß es auch intrazelluläre Bindungsstellen gibt (90, 91), und daß wenigstens ein

Teil des gebundenen Hormons in die Zellen transportiert wird, wo er noch unbekannte Wirkungen entfaltet und abgebaut wird. Über diesen Vorgang ist noch wenig bekannt, er ist bisher nur an Hepatozyten (92 - 94) und Fettzellen (95) untersucht worden. Es ist daher von Interesse zu untersuchen, ob phagozytierende Zellen, falls sie Insulin binden, dieses nach dem gleichen Mechanismus wie Hepatozyten ins Zellinnere schaffen.

Zur Untersuchung des Transportvorganges sind mehrere Mechanismen in Betracht zu ziehen:

Der direkte Einstrom in die Zellen, eventuell unter Zuhilfenahme von Carriersystemen.

Das Übertreten von Membrananteilen mitsamt dem rezeptorgebundenen Hormon in die Zelle im Sinne von Pinocytose oder der "membrane flow" Hypothese (96).

Die zweite Möglichkeit läßt sich durch Einsatz von Substanzen, die das mikrotubuläre oder das mikrofilamentäre System hemmen (96, 97) prüfen. Wenn dadurch der Transport von Membrananteilen zum Ort des Hormonabbaus gehemmt wird, ist mehr Aktivität im Membrananteil der Zelle und weniger im löslichen Kompartiment zu erwarten. Die dazu erforderliche Auftrennung der Zellen in eine membranöse und eine cytosolische Fraktion kann durch hypoosmolare Behandlung oder durch Einwirkung von Digitonin (99) erfolgen.

Trifft dagegen die erste Möglichkeit zu, was wegen der Größe des Insulinmoleküls recht unwahrscheinlich ist, so dürfte der Einsatz der genannten Hemmstoffe keinen Einfluß auf membrangebundene oder cytosolische Aktivität haben.

Wenn in Makrophagen Hormon rezeptorgebunden vorliegt, muß die Aktivität der Membranfraktion unter Phagozytosebedingungen zunehmen, da mit dem phagozytierten Partikel auch die umhüllende Membran in die Zelle geschleust wird, durch den so beschleunigten Membransatz also mehr Membranfläche zur Bindung bereitsteht.

Der Vergleich zwischen Kupfferzellen und anderen Makrophagen bezüglich ihrer Rezeptorausstattung gestattet Rückschlüsse auf die Stellung der Kupfferzellen im Makrophagensystem. Über diesen Punkt herrscht zur Zeit noch große Uneinigkeit: Einmal wird die Ansicht vertreten, Kupfferzellen seien eigenständige, sich in der Leber replizierende Zellen, andererseits glaubt man beweisen zu können, daß sie aus Stammzellen im Knochenmark entstehen und mit dem Blutstrom in die Leber einwandern, später in die Lunge gehen, um dort ihr Dasein als Alveolarmakrophagen zu beenden (100 - 103). Zum Vergleich müssen also Makrophagen aus Knochenmark und Lunge untersucht werden.

2.1. Bindung und Abbau von Insulin

Für alle Experimente wurde ^{125}J Insulin verwendet, das unmittelbar vor dem Versuch durch Chromatographie an Sephadex G 50 von freiem $^{125}\text{J}^-$ und höhermolekularen Aggregaten befreit worden war. Abb. 18 zeigt ein typisches Elutionsdiagramm.

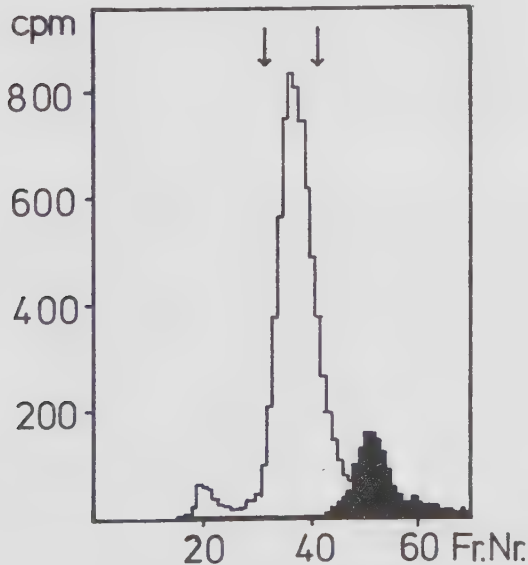


Abb. 18 : Reinigung von ^{125}J -Insulin an Sephadex G 50. Schwärzung $\hat{=}$ nicht TCA-fällbare Radioaktivität. Fraktionen zwischen den Pfeilen wurden für Versuche benutzt.

2.1.1. Bindung und Abbau von Insulin durch Hepatozyten

Die Hormonbindungs- und Abbaustudien wurden mit 5 bis 48 Stunden alten Hepatozytenkulturen durchgeführt. Die Insulinkonzentrationen wurden im Bereich der Werte im Pfortaderblut (68) gewählt, es wurde bei 4°C und 37°C gemessen. Die zellgebundene Aktivität betrug am Ende eines Versuch höchstens 3 % der eingesetzten Aktivität. Das Spülen und Lysieren des Zellrasens wurde im Kühlraum in möglichst kurzer Zeit vorgenommen, um unerwünschte Dissoziationseffekte und die Einwirkung unspezifischer Proteasen des Cytoplasmas einzuschränken (104).

Abb. 19 zeigt den zeitlichen Verlauf der Bindung aus einem 0,36 nM ^{125}J -Insulinmedium. Die Sättigung der bindenden Strukturen ist nach etwa 120 min erreicht.

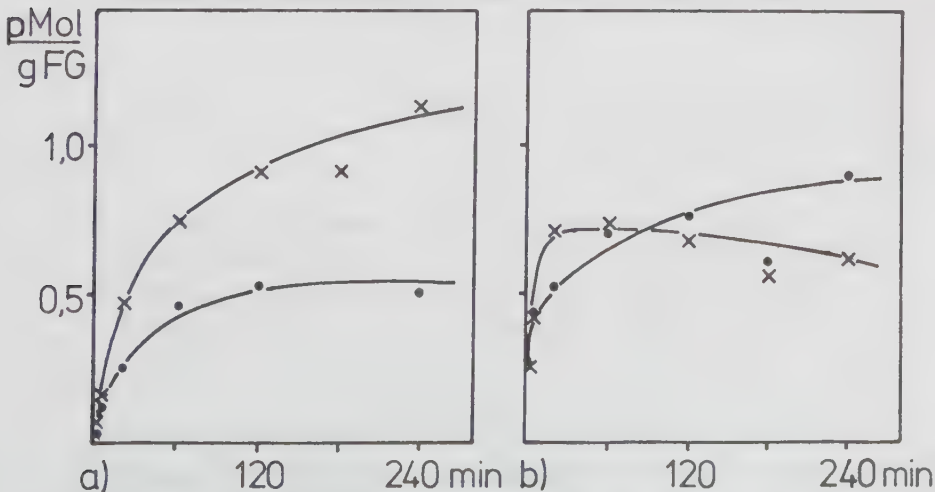


Abb. 19 : Insulinbindung an 24 h alte Hepatozyten bei 37°C und 4°C (x bzw. •) aus 0,36 nM Lösung. Aktivität in pMol im Membrananteil (a) und Cytoplasma von 1 g FG.

Die kompetitive Hemmung der ^{125}J -Insulin-Bindung durch steigende Konzentrationen nichtmarkierten Hormons ist in Abb. 20 zu sehen. In Gegenwart von 3 nMol/l kalten Insulins sinkt die Bindung des jodierten Hormons (Konzentration 36 pMol/l) auf weniger als 40 % des Wertes, der mit ^{125}J -Insulin allein gemessen wurde. Es fällt auf, daß der Effekt sich für den cytoplasmatischen Anteil weniger stark auswirkt.

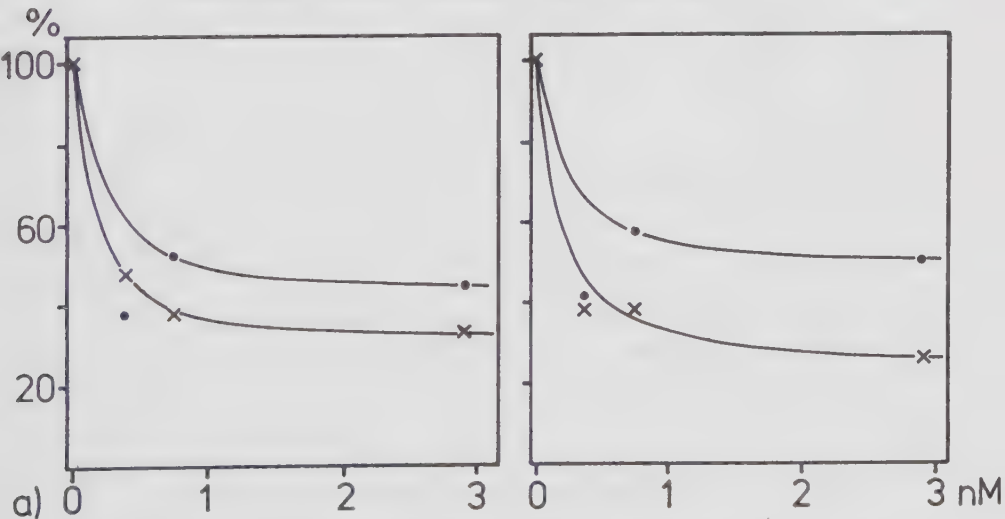


Abb. 20 : Kompetitive Hemmung der ^{125}J -Insulin-Bindung durch unmarkiertes Insulin bei 37°C (a) und 4°C (b) .im Membrananteil und cytoplasmatischen Anteil (x bzw. •) 100 % $\hat{=}$ Bindung aus 36 pM Lösung von reinem ^{125}J - Insulin.

Um den Insulinanteil zu bestimmen, der nach 120 min Bindungszeit noch von den bindenden Strukturen durch einen Überschuß kalten Hormons verdrängt werden kann,

wurde nach der genannten Zeit durch Zugabe konzentrierter Insulinlösung die Konzentration auf 14,5 nM angehoben. In Tab. 9 ist zu sehen, daß weniger als 30 % der membrangebundenen Aktivität dem konkurrierenden Hormon zugänglich waren. Die Aktivität im cytoplasmatischen Anteil wurde gar nicht verändert.

Zeit nach Zugabe (min)	Membrangeb. Akt. (pMol/g FG)		Änderg. (%)	Cytopl. Akt. (pMol/g FG)		Änderg. (%)
	+ kalt. Insulin	Kontr.		+kalt. Insul.	Kont.	
0		0,96			0,67	
60	0,74	0,96	-22,9	0,58	0,57	+1,4
120	0,79	1,14	-30,6	0,60	0,62	-3,6

Tab. 9: Verdrängung gebundener ^{125}J -Insulin-Aktivität im Membran- und Cytoplasmaanteil von Hepatozyten durch 14,5 nMol/l kaltes Insulin.

Um zu untersuchen, ob mikrofilamentäre oder mikrotubuläre Strukturen am Transport rezeptorgebundenen Insulins in die Zelle beteiligt sind, wurde den Kulturen 1 Stunde vor der Inkubation mit ^{125}J -Insulin 5 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin B oder 30 $\mu\text{Mol/l}$ Vinblastin zugesetzt. Der zeitliche Verlauf der Hormonbindung an die so vorbehandelten Zellen ist in Abb. 21 zu sehen. Cytochalasin B zeigt wenig Effekt, dagegen nimmt die membrangebundene Aktivität unter Vinblastin stark zu.

Jedoch beeinflussen beide Substanzen die cytoplasmatische Aktivität nur wenig.

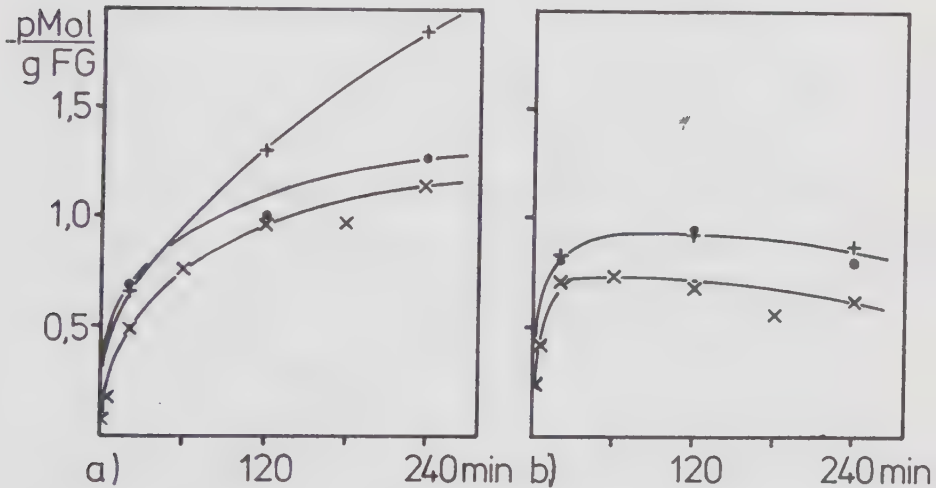


Abb.21 : Einfluß von Vinblastin (+), Cytochalasin B (•) auf Insulinaktivität im Membrananteil (a) und im cytoplasmatischen Anteil (b) von Hepatozyten bei 37°C. (x $\hat{=}$ Kontrollen) Insulinkonzentration 0,36 nM.

Mit zunehmendem Alter der Kulturen wurde mehr Insulin an die Membranfraktion gebunden. Jedoch war auffällig, daß eine besonders starke Zunahme der gebundenen Aktivität zwischen dem ersten und zweiten Tag erfolgte. Es sei schon an dieser Stelle vermerkt, daß die Glucagonbindung eine ähnliche Tendenz zeigte. Bemerkenswert war auch, daß junge Zellkulturen zu Beginn eines Bindungsversuchs das Insulin zu langsam banden. Dieser Befund spricht dafür, daß das Insulin bindende System

aus mehreren Komponenten unterschiedlicher Affinität besteht, die verschieden schnell regeneriert werden. Gesetzt den Fall, es wäre nur eine insulinbindende Struktur zu ersetzen, von der frische Zellen nach der Enzymbehandlung nur y Prozent enthalten, so müsste man an frischen Zellen zu jedem Zeitpunkt der Inkubation stets y Prozent der Aktivität älterer Zellen messen. Wie Tab.10 aber zeigt, ist dies nicht der Fall. Da junge Zellen zu Beginn der Inkubation einen niedrigeren Prozentsatz an Aktivität binden als gegen Ende, ist zu schliessen, daß eine schnellbindende Struktur noch nicht genügend ersetzt worden ist.

Alter der Kultur (Stunden)	Inkubations- zeit (min)	$(B_x / B_{48}) \cdot 100$	
		37°C	4°C
5	1	15	17
	20	39	32
	60	57	36
24	1	26	13
	20	51	49
	60	48	46

Tabelle 10 : Insulinbindung an Membrananteil von Hepatozyten in Abhängigkeit von der Kultivationszeit. Angabe der an x Stunden alte Kulturen gebundenen Aktivität B_x in Prozent der Bindung B_{48} an 48 h alte Kulturen

Nicht vom Alter der Kultur abhängig war dagegen der Abbau des Insulins, gemessen als TCA-fällbare Aktivität.

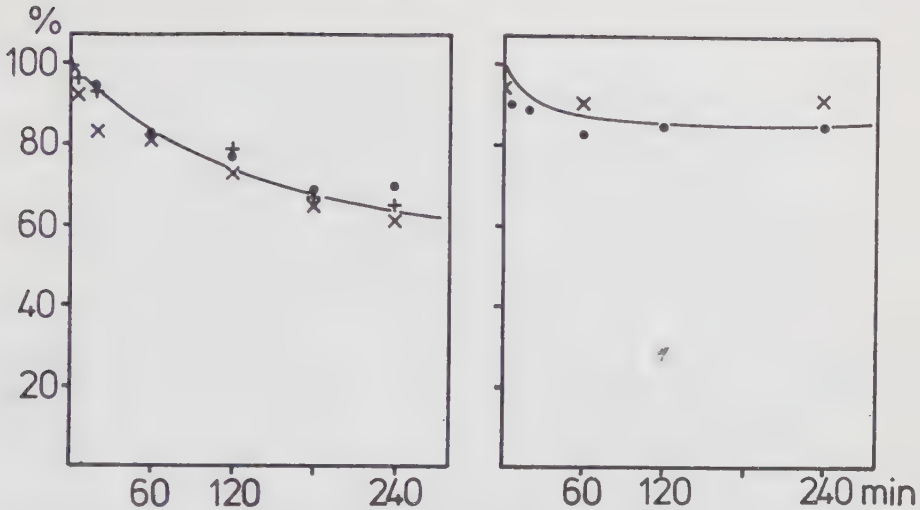


Abb.22 : Insulinabbau durch Hepatozytenkulturen, 5 h (x), 24 h (•) und 48 h (+) alt, bei 37°C (a) und 4°C (b).Angabe als TCA-fällbare Aktivität in Prozent von Kontrolle ohne Zellen

Erwartungsgemäß wurde bei tiefer Temperatur langsamer abgebaut als bei hoher, wenn auch der Vorgang nicht ganz zum Erliegen kam (Abb. 22).

2.1.2. Bindung und Abbau von Insulin durch Kupfferzellen

Für alle Studien mit Kupfferzellen wurden 24 h alte Kulturen verwendet. Die Abwesenheit von Hepatozyten und der Anteil Kohle- und Latex phagocytierender Zellen wurde stets überprüft. Auf einer Platte befanden sich etwa 1 Million Zellen.

Der zeitliche Verlauf der Bindung aus einem 0,36 nM Insulinmedium ist in Abb. 23 zu sehen, der Einfluß von Vinblastin, Cytochalasin B und Latexphagocytose in Abb. 24. Wie bei den Hepatozyten hat Cytochala -

sin B wenig Einfluß auf die gebundene Aktivität, unter Vinblastin liegt sie deutlich höher, und unter Phagocytose ist um über das Doppelte erhöht. Durch Kontrollen wurde sichergestellt, daß nicht etwa an Latex unspezifisch gebundenes Insulin diese Zunahme vortäuschte.

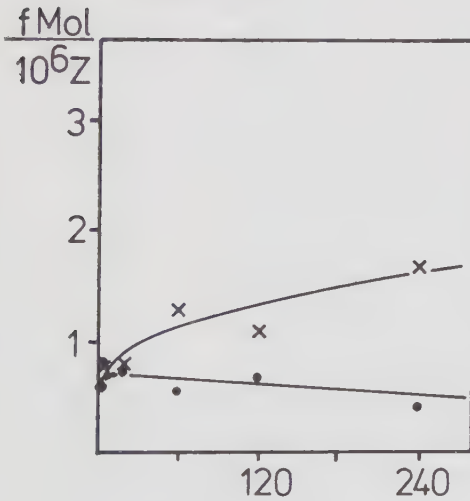


Abb. 23

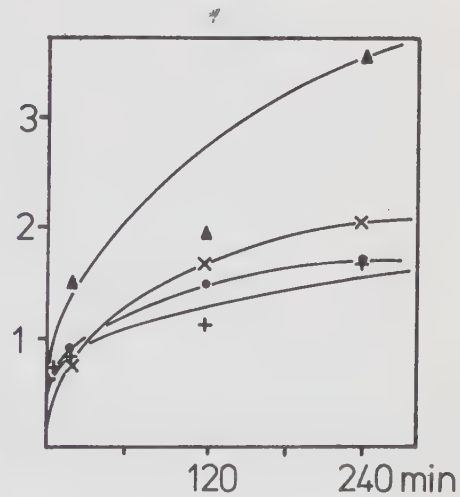


Abb. 24

Abb. 23 : Insulinbindung an Kupfferzellen bei 37°C (x) und 4°C (•) aus 0,36 nM Lösung. Membrananteil. Angabe in fMol / 10⁶ Zellen.

Abb. 24 : Insulinbindung an Kupfferzellen in Gegenwart von 30 µM Vinblastin (x), 5 µg/ml Cytochalasin B (•), Latexpartikel (10-15 je Zelle) (▲). (+ ≙ Kontrolle)

Die kompetitive Hemmung der ¹²⁵J-Insulin-Bindung durch kaltes Insulin fällt noch deutlicher aus als

bei Hepatozyten. Wie dort, ist kein Einfluß der Temperatur auf den Effekt festzustellen (Abb. 25).

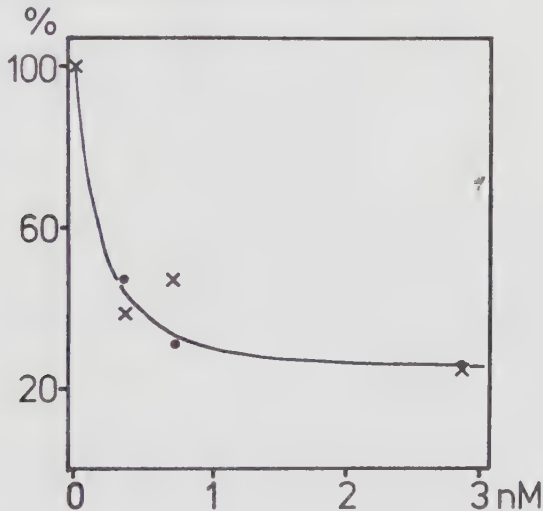


Abb. 25 : Kompetitive Hemmung der ^{125}J -Insulin-Bindung durch unmarkiertes Hormon bei 37°C und 4°C (x bzw. •) an Kupferzellen. 100 % $\hat{=}$ Bindung aus 36 pM ^{125}J -Insulin

Die membrangebundene Aktivität lässt sich durch nicht-markiertes Hormon wieder zum Teil verdrängen. Bei 37°C beträgt der Verlust nach 120 min 25 %, also fast ebensoviel wie bei Hepatozyten (Tab. 11).

Die Inaktivierung von Insulin durch Kupferzellen ist bei der relativ geringen verfügbaren Zellzahl je Platte ein sehr langsamer Prozeß. Die Zelldichte konnte wegen der relativ geringen Ausbeute nicht beliebig erhöht werden. (Abb. 26).

Zeit nach Zugabe (min)	Membrangeb. Aktivität (fMol/10 ⁶ Z)		Änderung (%)
	+ kaltes Insulin	Kontrolle	
0		1,11	
60	0,95	---	
120	1,27	1,69	-24,9

Tab. 11 : Verdrängung membrangebundener ¹²⁵J-Aktivität von Kupfferzellen durch 14,5 nMol/l kaltes Insulin

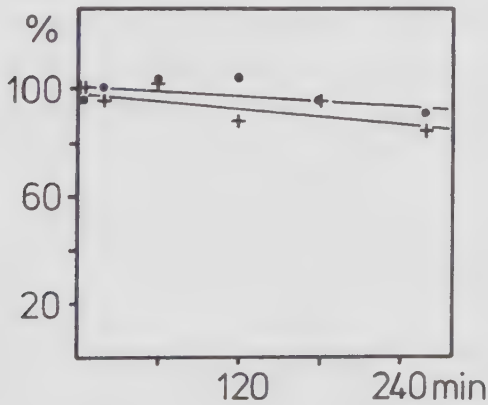


Abb. 26 : Insulinabbau durch Kupfferzellen bei 37°C (+) und 4°C (•). Angabe als TCA-fällbare Aktivität in Prozent von Kontrolle ohne Zellen.

2.1.3. Bindung und Abbau von Insulin durch aktivierte und nichtaktivierte Alveolarmakrophagen

Die Alveolarmakrophagen wurden, wie bereits beschrieben, durch Spülen der Lungen mit PBS gewonnen. Obwohl die Kulturen in den meisten Fällen über lange Zeit steril blieben, wurde doch sicherheitshalber 3 Stunden nach der Aussaat mit den Versuchen begonnen. Das mittlere Verhältnis vom Feuchtgewicht zum Medium betrug 8,8 mg/ml für aktivierte und 6,7 mg/ml für nichtaktivierte Alveolarmakrophagen. Den Zeitverlauf der Bindung aus 0,36 nM Medium zeigt Abb. 27. Dabei weisen die aktivierten Makrophagen eine viel geringere Bindungskapazität als die nichtaktivierten auf.

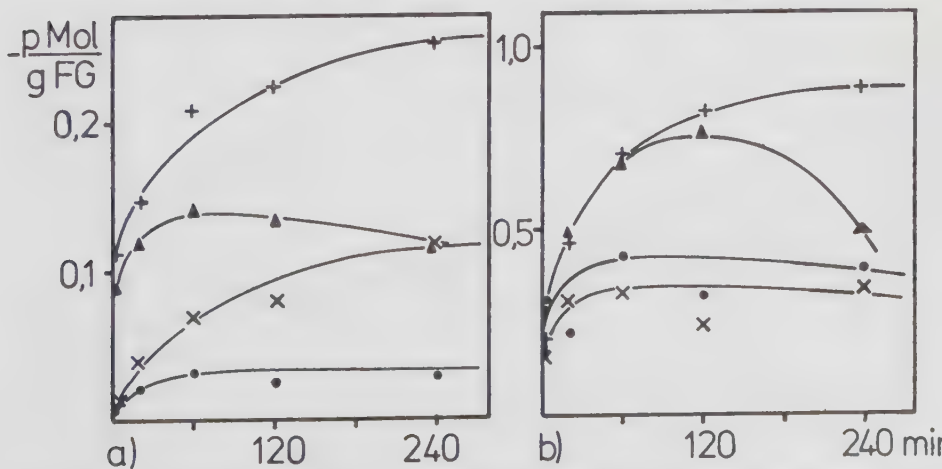


Abb. 27 : Insulinbindung an Membrananteil (a) und cytoplasmatischen Anteil (b) von aktivierten (x $\hat{=}$ 37°C, ● $\hat{=}$ 4°C) und nichtaktivierten Alveolarmakrophagen (+ $\hat{=}$ 37°C, ▲ $\hat{=}$ 4°C) aus 0,36 nM Lösung. Angabe in μMol je g Feuchtgewicht.

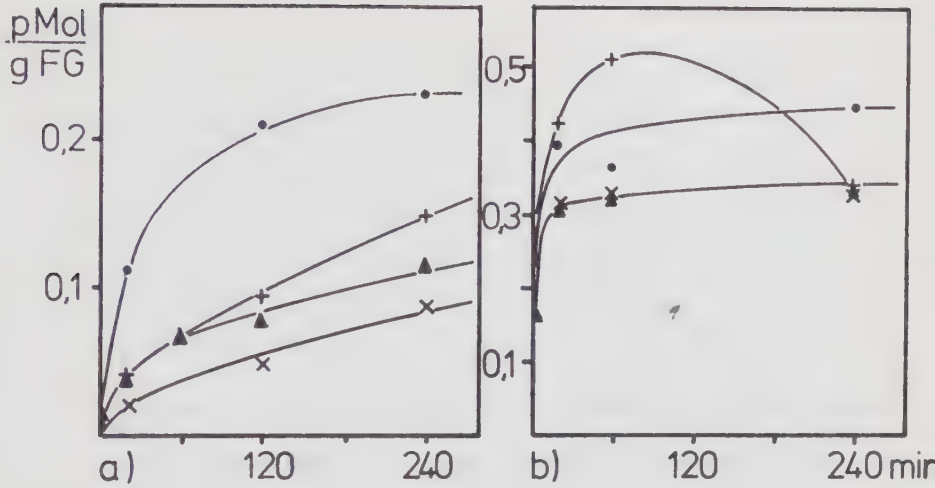


Abb. 28: Insulinbindung an Membrananteil (a) und cytoplasmatischen Anteil (b) von aktivierten Alveolarmakrophagen bei 37°C in Gegenwart von $30 \mu\text{M}$ Vinblastin (x), $5 \mu\text{g/ml}$ Cytochalasin B (+) oder Latexpartikel (•). ($\Delta \hat{=}$ Kontrolle)

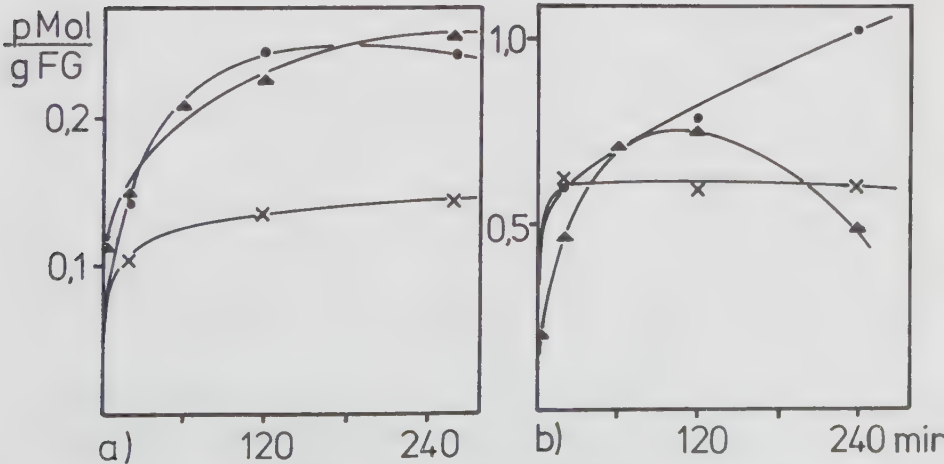


Abb. 29: Insulinbindung an nichtaktivierte Alveolarmakrophagen. Zusätze und Symbole wie in Abb. 28

In den Abb. 28 und 29 sind die Bindungskinetiken nach Vorinkubation mit Vinblastin oder Cytochalasin B sowie unter Phagocytosebedingungen dargestellt. Anders als bei Hepatozyten und Kupfferzellen nimmt unter Vinblastin die Insulinbindung nicht zu, und auch nach Phagocytose findet sich nur in den aktivierten Alveolarmakrophagen vermehrte Bindung.

In Abb. 30 wird die kompetitive Hemmung der ^{125}J -Insulin-Bindung durch nichtmarkiertes Insulin gezeigt. Die Verhältnisse sind ähnlich wie bei Kupfferzellen und Hepatozyten.

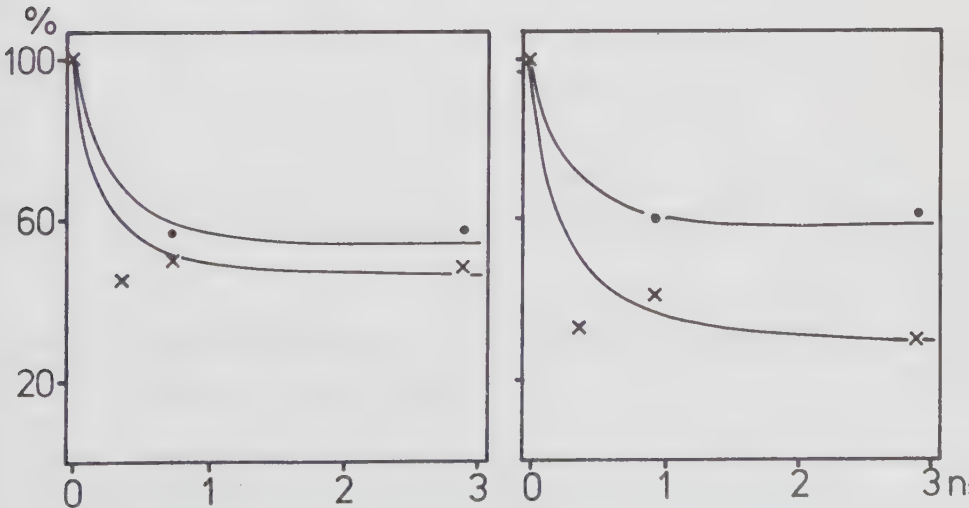


Abb. 30: Kompetitive Hemmung der ^{125}J -Insulinbindung an aktivierte Alveolarmakrophagen bei 37°C (a) und 4°C (b) durch nichtmarkiertes Insulin. x $\hat{=}$ Membrananteil, • $\hat{=}$ cytoplasmatischer Anteil. 100 % $\hat{=}$ Bindung aus 36 pM Lösung reinen ^{125}J -Insulins

Sowohl aktivierte als auch nichtaktivierte Alveolar-makrophagen bauen Insulin nur sehr langsam ab, der Aktivierungsgrad hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Abbaurrate (Abb. 31)

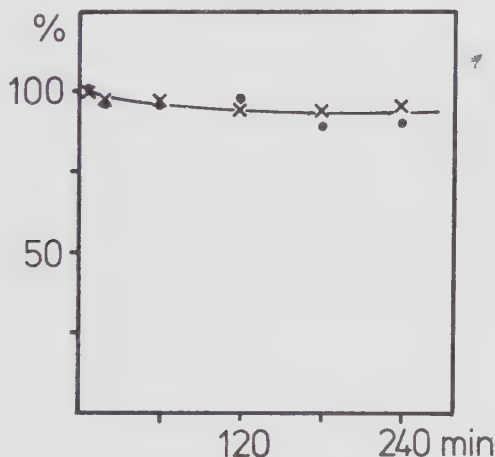


Abb. 31 : Abbau von Insulin durch aktivierte (x) und nichtaktivierte Alveolarmakrophagen (•) bei 37°C.

2.1.4. Bindung von Insulin durch Peritonealgranulozyten und Knochenmarksmakrophagen

Die Peritonealgranulozyten wurden unmittelbar nach der Präparation in Suspension mit ^{125}J -Insulin inkubiert, da sie sich nicht auf Gewebekulturschalen absetzen. Die mittlere Zellkonzentration betrug 5,2 mg/ml. Die Zellen wurden in Kunststofffläschchen mit einer Carbogenatmosphäre im Wasserbad (37°C) inkubiert. Abb. 32 gibt

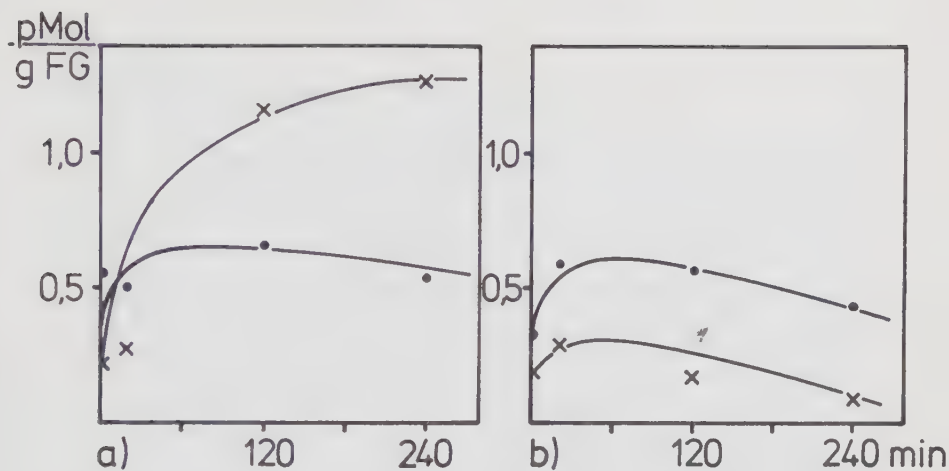


Abb.32 : Insulinbindung an Membrananteil (a) und cytoplasmatischen Anteil (b) von Peritonealgranulozyten bei 37°C (x) und 4°C (•). Angabe in pMol je Gramm FG

die Befunde wieder.

Die Knochenmarksmakrophagen wurden aus Mäusen gewonnen, die durchschnittliche Einsaat je Platte betrug 5,2 mg. Es konnte nur bei 37°C gemessen werden, auch musste die Trennung in Membranfraktion und cytoplasmatische Fraktion entfallen. Die Werte in Tabelle 12 enthalten also die an ganze Zellen gebundene Aktivität.

Inkubationszeit (min)	Gebundene Aktivität (pMol/g FG)
1	0,35 ± 0,11
5	0,57 ± 0,05
20	0,43 ± 0,12
60	0,45 ± 0,03

Tab.12: Insulinbindung an Knochenmarksmakrophagen der Maus

2.2. Bindung und Abbau von Glucagon

Beim Studium der Glucagonbindung an die verschiedenen Zellarten wurde mit der schon beim Insulin beschriebenen Technik gearbeitet. Das ^{125}J -Glucagon brauchte nicht vorher gereinigt werden, da sich die Herstellerangabe über einen Anteil von weniger als 1 % freien ^{125}J odids als korrekt erwies.

Zur Bestimmung der Abbaurate wurde hingegen nicht die Fällbarkeit mit Trichloressigsäure herangezogen, da diese Methode mit einem so kleinen Peptid wie Glucagon zu ungenauen Ergebnissen lieferte. ^{125}J -Glucagon und ^{125}J -haltige Abbauprodukte wurden vielmehr nach Auftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt.

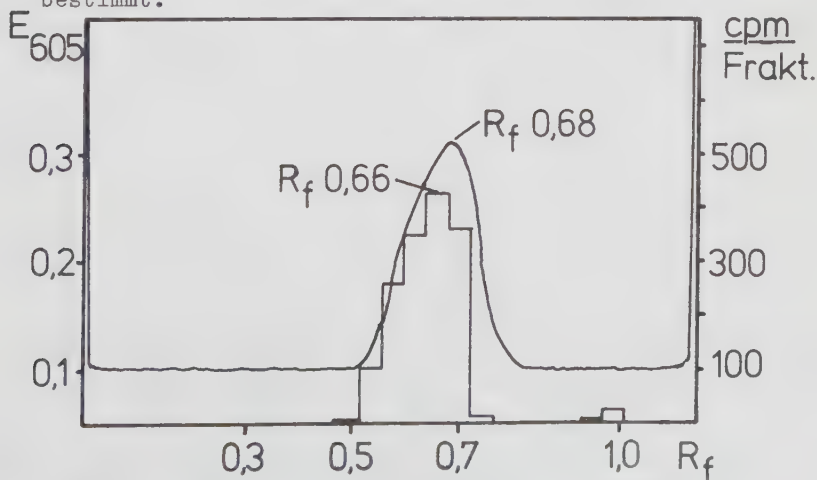


Abb.33: SDS-PAGE von nativem (R_f 0,68) und Mono- ^{125}J -Glucagon (R_f 0,66)

Die in Abb.33 gezeigte SDS-PAGE von nativem und ^{125}J -Glucagon ergab leicht differierende R_f -Werte, wie dies auch bei (105) beobachtet wurde.

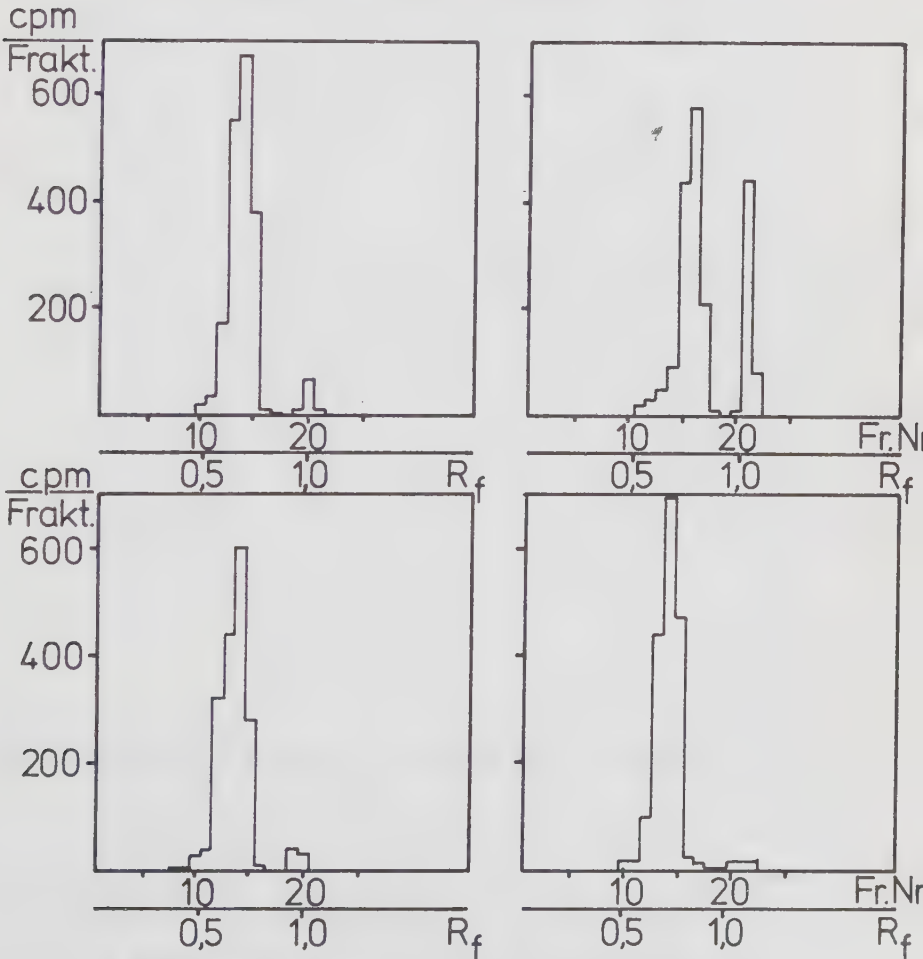


Abb.34 : Glucagonabbau durch 24 h alte Hepatozyten. SDS-PAGE des Mediums nach verschiedenen Inkubationszeiten : a) 1 min, 37°C, b) 120 min, 37°C, c) 120 min, 4°C, d) Medium ohne Zellen, 10^{-8}M , 120 min, 37°C

Die Abb. 34 a-d zeigen, wie der Glucagonabbau verfolgt werden konnte. Nur wenn das Glucagon-Medium mit Zellen bei 37°C inkubiert wurde, entstand ein schnell wanderndes markiertes Produkt mit einem R_f -Wert größer als 1. Die Molmasse dieser Verbindung ist daher wahrscheinlich noch niedriger als die von Phenolrot ($M = 354,5$), auf das sich die R_f -Berechnungen beziehen.

Weiterhin fiel auf, daß der R_f -Wert des Hauptgipfels größer wurde. Diese Verschiebung war schon nach 15 min zu bemerken, sie betrug nach 120 min fast 0,1 Einheit. In der Kälte blieb der R_f -Wert konstant. Leider konnte mit der gegebenen Trennleistung der Hauptgipfel nicht weiter aufgelöst werden. Die Angaben über den Glucagonabbau beziehen sich daher vorläufig stets auf den Anteil des niedermolekularen Produkts.

2.2.1. Bindung und Abbau von Glucagon durch Hepatozyten

Die Versuche wurden mit 5, 24 und 48 Stunden alten Hepatozytenkulturen unternommen. Wegen der schnellen Sättigung und des raschen Abbaus des Hormons wurde die Bindung nur bis zu 60 min lang gemessen. Die mittlere Einsaat je Platte betrug 12,8 mg. In der Abb. 35 sind die Bindungskinetiken in Abhängigkeit

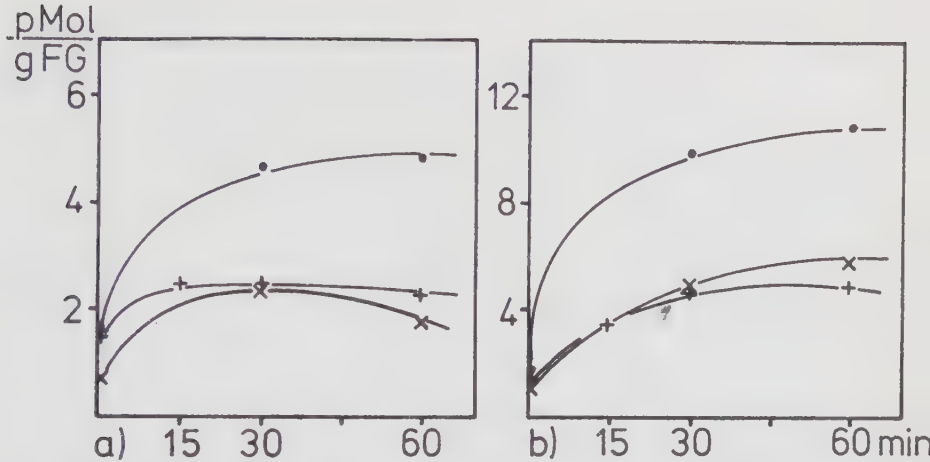


Abb.35 : Glucagonbindung aus 10^{-8} M Lösung an Hepatozyten nach 5 h (x), 24 h (+) und 48 h (•) Kultivationszeit. Membrananteil bei 37°C (a) und 4°C (b). Angabe in pMol je Gramm Feuchtgewicht

von der Temperatur und dem Alter der Kulturen dargestellt. Wieder fällt die starke Steigerung der gebundenen Aktivität nach 48 Stunden auf.

Glucagon wurde durch Hepatozyten recht schnell abgebaut, erwartungsgemäß in der Wärme schneller als in der Kälte, bei 4°C waren kaum Abbauprodukte nachweisbar. Das Alter der Kulturen hatte keinen Einfluß auf die Abbaurate von 10^{-8} M Glucagon (Abb. 36 a + b)

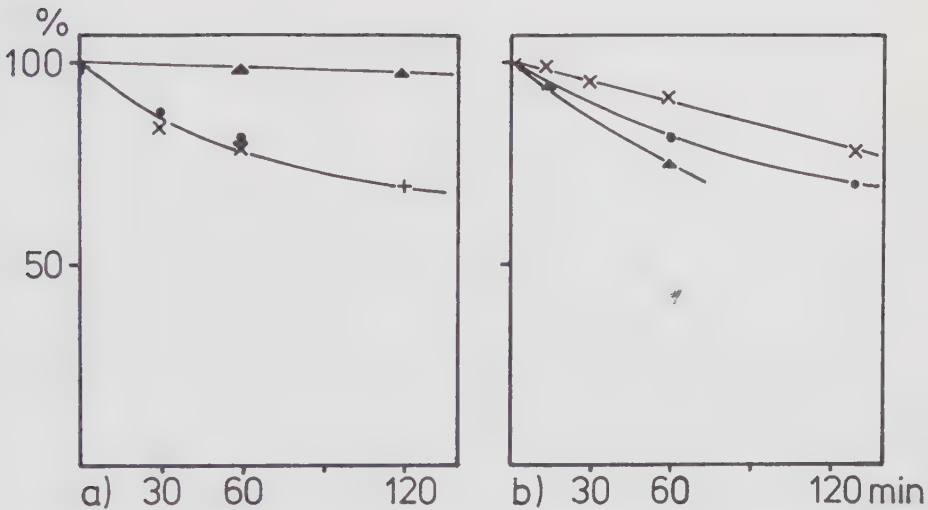


Abb. 36: Glucagonabbau durch Hepatozytenkulturen a) Abhängigkeit von der Kultivationsdauer, x $\hat{=}$ 5 h, + $\hat{=}$ 24 h, ● $\hat{=}$ 48 h, 10⁻⁸ M Glucagon, 37°C, ▲ $\hat{=}$ 24 h, 4°C. b) Konzentrationsabhängigkeit: x $\hat{=}$ 10⁻⁶ M, ● $\hat{=}$ 10⁻⁸ M, ▲ $\hat{=}$ 10⁻⁹ M.

2.2.2. Bindung und Abbau von Glucagon durch Kupfferzellen

Für diese Versuch wurden 24 h alte Kupfferzellkulturen mit einer durchschnittlichen Zellzahl von $1,26 \cdot 10^6$ je Kulturgefäß eingesetzt. Kinetiken der Bindung und des Abbaus werden in Abb. 37 und 38 gezeigt, beachte den gegenüber anderen Abbildungen veränderten Maßstab der Abbaukinetik!

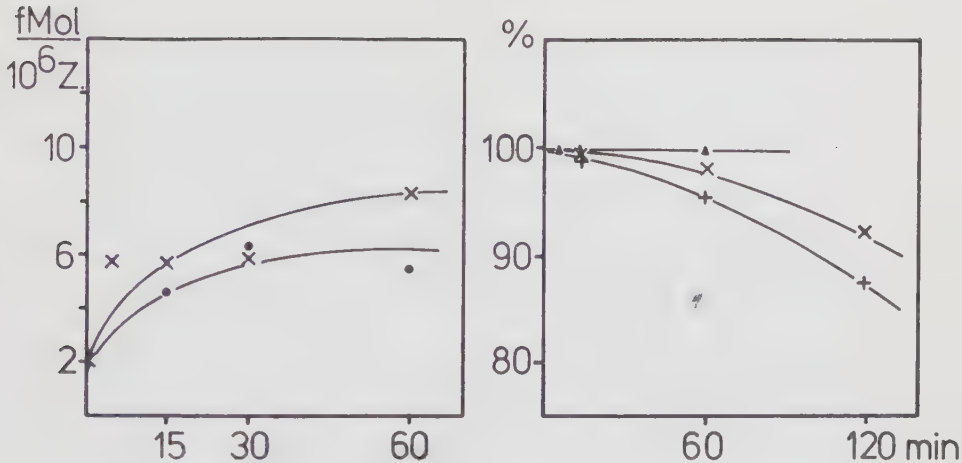


Abb. 37 : Glucagonbindung an Kupfferzellen aus 10^{-6} M Lösung (Membrananteil) bei 37°C (x) und 4°C (•). Angabe in fMol je 10^6 Zellen.

Abb. 38 : Glucagonabbau durch Kupfferzellen bei 37°C (x $\hat{=}$ 10^{-6} M, • $\hat{=}$ 10^{-8} M), und 4°C (▲ $\hat{=}$ 10^{-8} M). Angabe als % verbleibende Aktivität im Hauptgipfel der SDS-PAGE

2.2.3. Bindung und Abbau von Glucagon durch nichtaktivierte Alveolarmakrophagen

Die nichtaktivierten Alveolarmakrophagen erfuhren dieselbe Präparation und Vorbehandlung wie die für die Insulinbindung verwendeten Zellen. Die mittlere Einsaat betrug 2,96 mg je Kulturgefäß.

Es ließ sich jedoch im untersuchten Konzentrationsbereich von 10^{-6} bis 10^{-9} M Glucagon keine über den Leerwert hinausgehende Bindung von Glucagon an die Zell-

membran feststellen. Dementsprechend verlief auch der Abbau des Glucagons sehr langsam, wie Abb. 39 zeigt. Obwohl die Zellkonzentration um ein Mehrfaches höher lag als bei den Kupferzellkulturen, verlief der Abbau dennoch wesentlich langsamer, es bestand fast kein Unterschied zwischen den Abbauraten bei 37°C und 4°C.

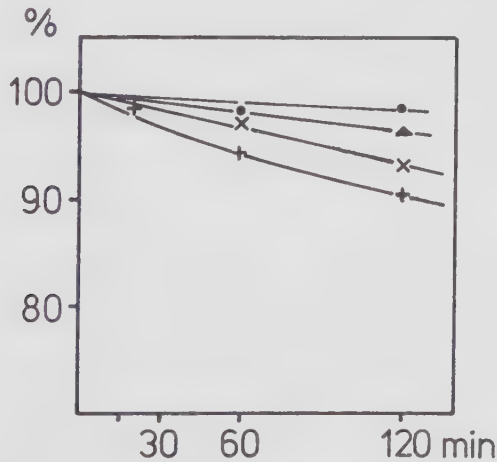


Abb. 39: Abbau von Glucagon durch nichtaktivierte Alveolar-makrophagen bei 37°C (x $\hat{=}$ 10^{-6} M, + $\hat{=}$ 10^{-8} M) und 4°C (● $\hat{=}$ 10^{-6} M, ▲ $\hat{=}$ 10^{-8} M) Angabe in Prozent der verbleibenden Aktivität im Hauptgipfel der SDS-PAGE.

C. DISKUSSION

1. Simultanpräparation von Hepatozyten und Sinusoidalzellen

Das hier beschriebene Verfahren gestattet es, aus der Leber eines einzigen Tieres innert 2 Stunden vitale Hepatozyten und Sinusoidalzellen in hoher Ausbeute zu isolieren. Vergleichende Untersuchungen zwischen den beiden Zellarten und über ihren Beitrag zu den Leistungen des Gesamtorgans werden dadurch erleichtert und aussagekräftiger.

Die Ausbeute an Hepatozyten betrug $100,6 \pm 28,2 \cdot 10^6$ Zellen (entsprechend 770 mg Feuchtgewicht) je 100 g Körpergewicht der Ratte. Die Eignung der Zellen zur Untersuchung von Leberfunktionen ist in diesem Labor ausführlich geprüft worden (32, 33). Die dabei erhobenen Befunde sind zu ergänzen um die Feststellung, daß auch der sehr empfindliche Na^+ - und K^+ -Gradient zwischen Zellinnerem und Medium nach der Präparation schnell wieder den Werten der Ganzleber zusteuert.

Ein weiterer Hinweis auf die gute Vitalität der Zellen ist die hohe Ausbeute, mit der sie sich auf Gewebekulturplatten absiedelten.

Die Darstellung der Sinusoidalzellen erfolgte schonen-

der, mit weniger Material- und Zeitaufwand als in älteren Arbeiten (28, 37). Die Ausbeute betrug 77,5 $\pm$ 21,8 $\cdot 10^6$ Zellen (entsprechend 47,5 mg Feuchtgewicht) je 100 g Körpergewicht der Ratte. Der Anteil kohlephagozytischer Zellen stimmte mit etwa 35 % gut mit den Angaben anderer Autoren (30, 116) überein. Die so erhaltenen Zellen verloren weniger intrazelluläre Enzyme ins Inkubationsmedium, hatten somit besser erhaltene Membranen als Zellen früherer Arbeiten (2).

Die Ausbeute beider Zellklassen stimmte recht gut mit den Angaben anderer Autoren (18, 22, 37, 65.) überein, die jeweils nur eine Zellklasse isolierten.

Für die Zellkultur erwiesen sich die Sinusoidalzellen allerdings als ungeeignet.

2. Hepatozytenkulturen

Die Beobachtung, daß sich Hepatozyten rasch und in guter Ausbeute auf Kulturgefäßen absiedeln, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht (59, 60, 106). Auch das Bestreben der Zellen, Trabekelstrukturen wie in der Leber wiederherzustellen, wurde mehrfach beschrieben (59, 107 - 108). Noch ist jedoch nicht bekannt, wodurch dieser Vorgang ausgelöst und gesteuert wird. Man weiß nicht, ob die Hepatozyten zielgerichtet auf einander zuwandern, oder ob sie bei ungerichteter Be-

wegung zufällig Kontakt finden und aneinander haften bleiben. Da nach (59) die polare Struktur der Zellen im Organ (Membranstrukturen an der Sinusoidal- und Gallengangsfront sowie zwischen benachbarten Zellen sind elektronenmikroskopisch und histochemisch sehr verschieden aufgebaut) während der Präparation verloren geht, und die Orientierung der Golgiapparate auf Gallengangsstrukturen in der Kultur erst nach ungefähr 24 Stunden wiederhergestellt ist, sieht es nicht so aus, als könnten die Hepatozyten gezielt wandern oder chemotaktisch wirksame Stoffe gerichtet abgeben. Ursachen und Mechanismus dieser Selbstorganisation können daher zur Zeit noch nicht erklärt werden.

Das lichtmikroskopische Bild der Kulturen blieb während der ersten drei Tage im wesentlichen unverändert. Erst danach starben die Zellen langsam ab. Durch Auswiegen der Zellmasse im ausgetauschten Medium konnte gezeigt werden, daß in den ersten drei Tagen weniger als 5 % der Einsaat verloren gingen.

Für den Erhalt der biochemischen Funktionen der Hepatozyten innerhalb der ersten 48 Stunden sprechen die Konstanz der Spiegel energiereicher Metabolite, die gleichbleibende Rate energieverbrauchender Reaktionen sowie das anhaltende Vermögen der Zellmembran, Farbstoffe auszuschliessen. Da eine gesteigerte Mitoserate

nicht nachgewiesen werden konnte, war auch eine Entdifferenzierung der Zellen auszuschließen.

Die Befunde zeigen daher, daß die kultivierten Hepatozyten in den ersten zwei Tagen in Kultur wesentliche Eigenschaften beibehielten. Eine Verlängerung der Lebensdauer wäre durch Zusatz von Insulin zum Kulturmedium möglich (107), jedoch müsste man wegen der raschen Inaktivierung des Hormons durch die Zellen mit hohen Konzentrationen beginnen - was jedoch die Rezeptorzahl beeinflusst (109), oder das Medium kontinuierlich austauschen (sog. Perifusion) (60).

3. Kupfferzellkulturen

Die vorliegende Arbeit konnte die Ergebnisse von MUNTHER - KAAS (65) insoweit nicht bestätigen, als sich mit Collagenase und Pronase behandelte Zellen nicht auf den Kulturgefäßen absiedelten. Nach Variation verschiedener Parameter blieb nur der Schluß übrig, daß die Collagenasebehandlung die Fähigkeit der Zellen zur Absiedelung beeinträchtigte. Es finden sich auch in der Literatur mit einer Ausnahme (110) nur Kultivationsversuche mit allein Pronase - behandelten Zellen (62,63,111). Welche Struktur oder Funktion der Zellen durch die Collagenasebehandlung beeinträchtigt wird, so daß sie sich nicht absiedeln, konnte noch nicht geklärt werden.

Die allein mit Pronase isolierten Sinusoidalzellen waren bezüglich des Anteils kohlephagozytischer Zellen und der Kontamination mit Hepatozyten mit den Zellen aus der kombinierten Präparation durchaus vergleichbar. Wie bei dem aggressiven Verfahren nicht anders zu erwarten, war die Ausbeute etwas geringer und der Anteil Trypanblau-aufnehmender Zellen etwas höher. Die Ausbeute bewegte sich jedoch im Rahmen der für dieses Verfahren angegebenen Werte (111, 112). Die Absiedelungsquote auf den Kulturgefäßen betrug 16,2 % (bezogen auf den Anteil Kohle-phagozytischer Sinusoidalzellen) und 52,5 % (bezogen auf Latex-phagozytische Zellen).

Die Kupfferzellen siedelten sich bald nach der Einsaat auf den Kulturschalen ab, die größtmögliche Ausbeute wurde aber erst nach 24 Stunden ungestörter Absiedelungszeit erreicht. Als günstigstes Gefäßmaterial erwies sich Polystyrol.

Die Identität der abgesiedelten Zellen mit Kupfferzellen konnte durch die Analyse des Phagozytoseverhaltens und durch den Nachweis von Peroxidase gezeigt werden. Von allen Sinusoidalzellen enthalten allein die Kupfferzellen Peroxidase und nur sie können Partikel von mehr als $0,1 \mu\text{m}$ Durchmesser aufnehmen (110, 111, 113). Da die Zellen identische Phagozytoseindizes von mehr

als 90 % für Kohle- und Latexpartikel ($\approx 1,0 \mu\text{m}$) sowie einen damit übereinstimmenden Färbungsindex für Peroxidase aufwiesen, ist der Schluß gerechtfertigt, daß es sich um reine Kupfferzellkulturen handelte. Wir haben auch im Gegensatz zu anderen Autoren (64) nach einer Woche noch kein Überwachsen anderer Zellarten beobachten können. Übereinstimmend damit war der Einbau von ^3H -Thymidin nicht nachweisbar.

Nach unseren Erfahrungen eignet sich die Peroxidasefärbung nicht gut zum routinemässigen Identitätsnachweis der Kupfferzellen. Sie fiel in kultivierten Zellen sehr viel schwächer aus als in frisch präparierten oder als in den Leukozyten von Blutaussstrichen, die zur Kontrolle ebenfalls gefärbt wurden. Ausserdem war das Enzym der kultivierten Zellen nur ohne vorherige Fixation nachzuweisen, nicht jedoch nach Behandlung mit 1 % Glutardialdehyd, 10 % Formalin, 70 % Äthanol oder Aceton. Das Leukozytenenzym war dagegen auch nach Fixation noch aktiv.

Die Beobachtung, daß kultivierte Kupfferzellen viel schlechtere Peroxidasefärbungen geben als solche in Leberschnitten, wurde mehrfach gemacht (111, 114), ohne daß dafür ein Grund - wie etwa Austritt des Enzyms ins Kulturmedium - gefunden werden konnte. Wegen der störungsanfälligen Peroxidasereaktion sollte nur der Phagozytoseindex für Latex zur Bestimmung der

Reinheit einer Kupfferzellkultur verwendet werden. Er dient gleichzeitig als Vitalitätsnachweis der Zellen, da nur lebende Zellen phagozytieren.

Einen wesentlichen Unterschied zu den Hepatozytenkulturen stellte die Unbeweglichkeit der Kupfferzellen dar. Zwar konnten die Zellen deutlich ihre Form verändern, sie waren jedoch nicht in der Lage, über die Platte zu wandern. Das ließ sich elegant dadurch zeigen, daß nach Einbringen von Kohlepartikeln in die Kulturen sich niemals Wanderungsspuren in der dünnen Schicht der sedimentierten Kohleteilchen fanden. Auch bildeten sich niemals Zell-Zell-Kontakte wie bei den Hepatozyten aus. Eine mit einem Gummischaber von Zellen befreite Fläche des Kulturgefäßes wurde auch im Laufe von Tagen nicht wieder durch benachbarte Zellen besiedelt.

Die Beobachtung, daß die Kupfferzellen phagozytierte Zellen im Verlauf von 24 bis 48 Stunden abbauen, wurde mehrfach gemacht (111, 115, 117). Die typische Sternform der Zellen stellte sich erst nach Abbau des phagozytierten Materials ein, blieb danach für Tage unverändert. Bot man den Zellen erneut viel Material zur Phagozytose an (Kohle, Latex), lösten sich die gefüllten, runden Zellen bald von der Platte. Die Kultivation bereitete nur selten Sterilitätsprobleme.

4. Bindung und Abbau von Insulin

In der Literatur finden sich nur wenige Arbeiten, die über Insulinbindung an intakte (73, 74, 92, 104, 118) oder kultivierte (109) Hepatozyten berichten. Von der Bindung an andere Leberzellen ist noch viel seltener die Rede (94). Während in den meisten zitierten Arbeiten die Charakterisierung des Insulinrezeptors im Vordergrund stand, konnten mit den hier gewonnenen Daten auch die Verteilung der Bindungs- und Abbaupazitäten auf die verschiedenen Leberzellen berechnet werden.

Für den Vergleich der Makrophagen untereinander war es nicht sinnvoll, die auf der Grundlage der Rezeptorzahl je Zelle zu vollziehen, da sich die Zellen in der Größe stark unterscheiden. Vorzuziehen ist die Zahl der Rezeptoren je Flächeneinheit. Die in Tabelle 13 angegebenen Oberflächen der verschiedenen Zellarten wurden entweder aus den in der Literatur gefundenen Durchmessern der Zellen errechnet, oder über die Zellzahl je Gramm Feuchtgewicht mit Hilfe der zu $1,1 \text{ g/cm}^3$ angenommenen Dichte berechnet. In beiden Fällen wurde von der idealisierten Vorstellung einer reinen Kugelform der Zellen ausgegangen. Trotz dieser stark vereinfachenden Annahmen ist ein deutlicher Unterschied in der Rezeptordichte zwischen Kupfferzellen und allen anderen untersuchten Makrophagenarten festzustellen.

	Hepatoz.	Kupfferz.	akt.A.M.	n.a.A.M.	Kn.M.M.
Dichte (g / cm ³) (Lit.)	1,12 (35)	1,076 (48)	1,1	1,1	1,1
Durchmesser (µm) (Lit.)	22,8 (35)	9,06 (48)	15,6	15,4	21,0
Zellzahl/g FG (x10 ⁹)	0,130	1,63	0,566	0,577	0,23
Oberfläche (µm ²)	1633	258	753	743	1380
Molek./Zelle (37°C; 0,36 nM Ins.)	4450 ± 1840	670 ± 490	84 ± 50	235 ± 77	1200 ± 290
Molek./Zelle (4°C; 0,36 nM Ins.)	2720 ± 950	410 ± 260	26 ± 13	140 ± 51	n.gem.
Molek./Zelle (37°C; 2,88 nM Ins.)	25060 ± 12300	3150	714 ± 127	n.gem.	n.gem.
Molek./Zelle (4°C; 2,88 nM Ins.)	14650 ± 8690	1700	184 ± 15	n.gem.	n.gem.
Molek./ µm ² (37°C; 0,36 nM Ins.)	2,73 ± 1,13	2,60 ± 1,90	0,11 ± 0,07	0,32 ± 0,10	0,87 ± 0,21
Molek./ µm ² (4°C; 0,36 nM Ins.)	1,67 ± 0,58	1,59 ± 1,01	0,03 ± 0,02	0,19 ± 0,07	n.gem.
Molek./ µm ² (37°C; 2,88 nM Ins.)	15,35 ± 7,53	12,2	0,95 ± 0,17	n.gem.	n.gem.
Molek./ µm ² (4°C; 2,88 nM Ins.)	8,97 ± 5,32	6,6	0,24 ± 0,02	n.gem.	n.gem.

Tabelle 13: Insulinbindungsstellen der in dieser Arbeit untersuchten Zellen. Angabe in gebundenen Molekülen nach 60 min Inkubation je Zelle oder je µm²-Zelloberfläche

Vergleicht man die in dieser Arbeit gemessenen Insulin- Bindungsstellen je einzelnen Hepatozyt mit den Angaben in der Literatur, so stellt man recht gute Übereinstimmung fest, obwohl die zitierten Werte teilweise auf anderem Wege gewonnen wurden (kinetische Analysen, Autoradiographie) Für andere Zellarten der Leber liegen keine Vergleichszahlen vor.

Lit.	Rezept./Zelle	Bedingungen
(73)	7 000	Insulin 0,36 nM, 30°C
	80 000	Insulin 17 nM, 30°C
(104)	15200 $\pm$ 1400	Steady state, 28 nM Ins.
	16 100	kinet.Analyse, 37° C
(109)	1810	Kultur neonataler Hepatozyten-Linie, 22°C
(93)	ca. 100 000	Autoradiographie von Leberschnitten
diese Arb.	4450 $\pm$ 1840	Insulin 0,36 nM, 37°C
	25060 $\pm$ 12300	Insulin 2,88 nM, 37°C

Tabelle 14: Insulinbindung an Hepatozyten, Vergleich mit Literaturangaben

Über den Transport rezeptorgebundenen Insulins in das Innere von Hepatozyten und Fettzellen ist mehrfach berichtet worden (90 - 95, 118 - 120). Auch in dieser

Arbeit konnte das rasche Auftreten markierter Produkte in der löslichen Fraktion aller untersuchter Zellen gezeigt werden. Die Frage nach einem gemeinsamen Transportmechanismus muß noch offenbleiben, da die Befunde nicht einheitlich ausfielen.

In Hepatozyten ist das mikrotubuläre System am Insulintransport beteiligt : Unter Vinblastin nimmt die Aktivität an der Membranfraktion zu. Unklar bleibt, warum trotzdem die cytosolische Aktivität nicht absinkt. Der ATP-Gehalt der Zellen scheint aber keinen Einfluß auf den Transportmechanismus zu haben. In einem orientierenden Versuch wurden Hepatozyten zwei Stunden mit 6 mM L-Ethionin vorinkubiert, das den ATP-Spiegel drastisch senkt (121). Bei der nachfolgenden Inkubation mit ¹²⁵J-Insulin in Gegenwart von L-Ethionin enthielten cytosolische und Membranfraktion ebensoviel Aktivität wie unbehandelte Kontrollen. Diese Befunde sprechen für einen der Pinozytose verwandten Mechanismus, sie wurden in ähnlicher Form auch für die Internalisierung membrangebundener Lectine erhoben (122).

Die Beobachtung , daß nicht alles membrangebundene Insulin von Hepatozyten (73, 104, 123) und Fettzellen (95) durch einen Überschuß kalten Hormons verdrängt werden kann, wurde für Hepatozyten und Kupfferzellen bestätigt und um den Befund erweitert, daß die Aktivität der löslichen Fraktion von diesem Austausch gar

nicht betroffen wird.

Bei Kupfferzellen und Alveolarmakrophagen fiel der Effekt von Vinblastin auf die membrangebundene Aktivität geringer aus als bei Hepatozyten, diese nahm jedoch bei Phagozytose stark zu. Es wird also das phagozytierte Teilchen von einem Membranteil umhüllt, der auch Insulinrezeptoren enthält.

Bemerkenswert ist, daß die Rezeptordichte aktivierter Alveolarmakrophagen geringer ist als die nichtaktivierter Zellen. Auch bei Inkubation aktivierter Alveolarmakrophagen mit ^{14}C -Glucose und Insulin in Konzentrationen von 0,36 bis 2,88 nM ließ sich keine signifikante Steigerung des Glucose-Einbaus in Glycogen feststellen. In Übereinstimmung mit neueren Arbeiten über den Glycogenstoffwechsel dieser Zellen (124) scheint also Insulin nicht an der Regulation des Glycogenspiegels beteiligt zu sein.

Als letztes sei auf den noch nicht erklärlichen Befund hingewiesen, daß die Internalisierung des Insulins in allen Zellen anscheinend nicht temperaturabhängig ist. Der Vorgang spielt sich bei 4°C zwar in den ersten Minuten langsamer ab als bei 37°C , nach kurzer Zeit sind die Werte jedoch fast identisch.

Die Abbaurrate des Insulins durch Hepatozyten liegt mit 3,65 pMol/ g·h aus 0,36 nM Insulinlösung gut im Bereich der Literaturangaben:

3,22 pMol/ g·h aus 0,33 nM Lösung, 30°C (74)
 13,5 pMol/ g·h aus 0,2 nM Lösung, 30°C (73)
 17,4 pMol/ g·h aus 0,1 nM Lösung, 37°C (104)
 jeweils an Einzelzellen gemessen, und

30,8 pMol/g·h aus 7,1 nM Lösung (70) gemessen an rezirkulierend perfundierter Leber. Von einigen Autoren beobachtete wesentlich höhere Raten lassen sich durch Austritt insulinabbauender Enzyme aus den Zellen erklären (104).

Kupfferzellen bauen Insulin etwa 50 mal schneller ab als Hepatozyten (Tabelle 15), damit wird eine Beobachtung von WAGLE et al. (79) bestätigt. Alveolarmakrophagen, die nur wenig Insulin binden, bauen es auch nur langsam ab.

	Hepatozyt.	Kupfferz.	akt.Alv.M.	n.akt.A.M.
Insulinabbau (pMol/ g·h)	3,65 ± 2,21	151,8 ± 127,8	0,146 ± 0,076	0,030
Glucagonabbau (pMol/ g·h)	10,9	2440		15,2

Tabelle 15 : Abbau von Insulin und Glucagon bei 37°C durch kultivierte Hepatozyten, Kupfferzellen und Alveolarmakrophagen

Der mit Kupfferzellen gemessene Wert ist verhältnismässig ungenau, da aus technischen Gründen (niedrige Zelldichte) nur ein geringer Teil des eingesetzten Insulins abgebaut wurde.

5. Bindung und Abbau von Glucagon

Für die in Tabelle 16 angegebenen Daten zur Glucagonbindung finden sich nur zwei Literaturangaben zum Vergleich : FREYCHET et al. (73) fanden bei Bindung aus 0,6 nM Lösung 11 000 besetzte Bindungsstellen je Hepatozyt, bei Bindung aus 29 nM Lösung 110 000 Bindungsstellen. SONNE et al. (75) geben die Zahl der Rezeptoren nach Messungen bei 20°C mit $2,1 - 3,4 \cdot 10^5$ je Zelle an. Die hier für 24 h kultivierte Hepatozyten gefundenen Werte liegen also im unteren Bereich dieser Angaben.

Über Glucagonbindung an Kupfferzellen ist in der Literatur bisher noch nicht berichtet worden. Bisherige Arbeiten beschränkten sich auf die Suche nach Glucagonabhängiger Adenylatcyclase in verschiedenen Leberzellarten. WINCEK et al. (80) fanden in(nach Phagozytose von Eisen)magnetisch isolierten Kupfferzellen keine Glucagon-stimulierbare Adenylatcyclase. FERRETTI et al. (81) erreichten in Nichtparenchymzellen eine 2 fache Stimulation der cAMP-Synthese durch Glucagon, REIK et al. (125) wiesen histochemisch in den Reti-

kuloendothelialzellen Glucagon-empfindliche Adenylatcyclase nach.

In Alveolarmakrophagen konnte keine Glucagonbindung nachgewiesen werden. Übereinstimmend damit erfolgte in diesen Zellen unter dem Einfluß des Hormons keine Glycogenolyse (124), der Glycogenspiegel wird also auf noch unbekannte Weise durch Aktivierungsgrad und Phagozytoseaktivität der Makrophagen gesteuert.

	Hepatozyten	Kupffer-Z.	n.akt.Alv.M.
Molek./Zelle (37°C)	10 400 ± 5750	3580 ± 1050	Ø
Molek./Zelle (4°C)	22 700 ± 6250	3870 ± 690	Ø
Molek./ µm ² (37°C)	6,4 ± 3,5	13,9 ± 4,1	Ø
Molek./ µm ² (4°C)	13,9 ± 3,8	15,0 ± 2,7	Ø

Tabelle 16 : Glucagonbindungsstellen bei 37°C und 4°C
nach 30 min Inkubation in 10⁻⁸M Lösung. Hepatozyten 24 h, Kupfferzellen 48 h alt.

Der Abbau des Glucagons erfolgte durch Kupfferzellen wesentlich schneller als durch Hepatozyten, so daß erstere, wie schon im Fall des Insulins, mehr als

50 % der Abbauleistung der Leber ausmachen können. Setzt man die bei (5) angegebenen Volumenanteile überschlägig gleich den Gewichtsanteilen, so tragen die Hepatozyten eines Gramms Leber mit 8,5 pMol/g.h zum Glucagonabbau bei, die Kupfferzellen aber mit 51,2 pMol/ g.h. Der hier gefundene Wert für den Glucagonabbau durch Hepatozyten deckt sich gut mit der Angabe bei (73) von 20,8 pMol/ g.h , während der bei (75) angegebene Wert von 117 μ Mol/ g.h auf eine Glucagon-abbauende Aktivität im Inkubationsmedium zurückzuführen war.

6. Beziehung der Kupfferzellen zu anderen Makrophagen

Die Frage, ob Kupfferzellen eine sich selbständig replizierende Zellart der Leber darstellen, oder ob sie von Vorläuferzellen des Knochenmarks abstammen und mit dem Blutstrom in die Leber gelangen, ist zur Zeit Gegenstand heftiger Debatten(101).

Zur Klärung dieser Frage ist eine Reihe von Funktionen und Eigenschaften der Kupfferzellen und fraglich verwandter Zellen untersucht worden : Histologie und elektronenmikroskopisches Bild (113), Zeitfolge des Auftretens dieser Zellen im Laufe der Fetalzeit(126), Chromatinstruktur nach Transplantation von Knochen -

markszellen anderen Kerngeschlechts (127), Mitoserate, Ausstattung mit Peroxidase, Esterasen, F_c - und C 3-Rezeptoren, Phagozytose- und Pinozytoseaktivität (102), biochemische Leistungen und Metabolitspiegel (124). Dabei konnte eine gewisse Ähnlichkeit zwischen Peritonealmakrophagen und Kupfferzellen gezeigt werden, während Alveolarmakrophagen stark abweichende Eigenschaften aufwiesen.

In dieser Arbeit wurden bezüglich der Besetzung mit Insulin- und Glucagonrezeptoren deutliche Unterschiede zwischen Kupfferzellen einerseits und Alveolar- und Knochenmarksmakrophagen andererseits aufgezeigt. Dies wird vor allem deutlich bei Betrachtung der Rezeptordichte je Flächeneinheit sowie der Geschwindigkeit des Hormonabbaus durch die verschiedenen Zellen.

Wenn Kupfferzellen aus anderen Reservoirs des Körpers in die Leber einwanderten, so wäre zu erwarten, daß die Rezeptordichten unter dem Einfluß der hohen Hormonkonzentrationen im Pfortaderblut (68) sinken müßten (109). Das Gegenteil ist der Fall, die Rezeptordichten sind deutlich höher.

Wenngleich nicht auszuschliessen ist, daß in die entzündete Leber phagozytierende Zellen einwandern, so sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, daß die Kupfferzellen der ruhenden, nicht entzündeten Leber nicht mit dem Blutstrom einwanderten, sondern selbständige Makrophagen sind.

D. ZUSAMMENFASSUNG

1. Hepatozyten und Kupfferzellen aus Rattenlebern wurden in nicht-proliferierende Primärkultur gebracht. Dazu wurde nach ergiebigen Präparationsmethoden und geeigneten Kultivationsbedingungen für die Zellen gesucht. Die Vitalität der Kulturen wurde überprüft. Hepatozytenkulturen waren mindestens 48 Stunden lang brauchbar, die Kupfferzellen mehr als 7 Tage lang.
2. Die Bindung von ^{125}J -Insulin und der Transport des Hormons ins Zellinnere wurde an Hepatozyten und Kupfferzellen gemessen und mit Alveolar- und Knochenmarksmakrophagen verglichen. Der Einfluß von Vinblastin und Cytochalasin B wurde studiert. In Gegenwart von Vinblastin binden Hepatozyten mehr Insulin, dies wird als Hinweis auf Beteiligung des mikrotubulären Systems am Hormontransport gedeutet. In Kupfferzellen und Makrophagen ist die Insulinbindung unter Phagozytose erhöht. Kupfferzellen bauen Insulin etwa 50 mal schneller ab als Hepatozyten, Alveolarmakrophagen 20 bis 100 mal langsamer.
3. Bindung und Abbau von Glucagon wurde an den verwendeten Zellarten untersucht. Alveolarmakrophagen binden kein Glucagon, ein weiterer Hinweis auf ihren andersartigen Glycogen-Stoffwechsel. Kupfferzellen bauen Glucagon 240 mal schneller ab als Hepatozyten.
4. Die Ergebnisse werden so interpretiert, daß Kupfferzellen der nicht entzündeten Leber nicht mit anderen Makrophagen verwandt sind.

E.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. GERÄTE UND CHEMIKALIEN, VERSUCHSTIERE

1.1. Geräte

Sterile Werkbank Modell T 130/0/UV der Fa. Dipl.Ing.
W. Ehret, 783 Emmendingen 14

Brutschrank Modell B 5060 EK der Fa. W.C. Heraeus GmbH,
Hanau.

Druckfiltrationsgerät 50 mm Ø, sowie Filterhalter 25
und 50 mm Ø und Nitrozellulosefilter Porengröße 0,2 µm
passend dazu, sowie Pneumatische Spritze System Antlia
der Fa. Schleicher und Schüll, 3354 Dassel

Sterile Petrischalen und Flaschen zur Gewebekultur von
Fa.C.A. Greiner, 744 Nürtingen und von Falcon Plastics,
Becton & Dickinson, Heidelberg

Braunülen 1 - G 16 und Schüttelinkubatoren der Fa. B.
Braun A.G., 3508 Melsungen

Peristaltikpumpe Multifix mit Doppelpumpenkopf der Fa.
A. Schwinherr, Schwäbisch - Gmünd

Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer 3380 mit
Absolute Activity Analyzer AAA 544 von Packard Instru-
ments Company, La Grange, Illinois, USA

Spektralphotometer 2400 mit Gelscanner - Zusatz von
Gilford Instrument GmbH, Düsseldorf

Photometer Eppendorf 1101 M und Flammenphotometer der
Fa. Netheler & Hinz GmbH, 2 Hamburg 63

Fraktionssammler LKB Ultrarac 7000-2 mit Uvicord II
Hettich Mikroliter Tischzentrifuge Nr. 3850 der Fa.
A. Hettich, Tuttlingen
Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer PRIAS PL von
Packard Instruments Comp., La Grange, Ill., USA
Phasenkontrastmikroskop Standard RA und Umkehrmikros-
kop der Fa. Carl Zeiss, 7082 Oberkochen
Spiegelreflexkamera Olympus OM 2 mit Mikroskopadapter
Glasgeräte-Sonderanfertigungen durch die Firmen B.Kum -
mer und C. Heintz, Freiburg

1.2. Chemikalien

^{125}J - Insulin ca. 50 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, ^{14}C -Dextran und Tritium-
wasser vom Radiochemical Centre, Amersham, England, UK
 ^{125}J -Glucagon ca. 150 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ von NEN, Dreieichenhain
 ^3H - Thymidin von Schwarz-Mann, Orangeburg, N.Y., USA
Collagenase B-grade von Worthington Biochemicals Corp.,
Freehold, N.J., USA
Pronase grade II von Calbiochem, San Diego, CA, USA
Phagozytoseversuche mit Rußdispersion C11-1431a der
Fa. Dia Nielsen, 516 Düren
Substanzen zum Herstellen der Kulturmedien, Kälber-
serum, Biochemikalien von Serva GmbH, 69 Heidelberg
Enzyme, Coenzyme, Reagentiensätze, Substanzen zur Be-
reitung der Kulturmedien, Kälberserum von Boehringer-
Mannheim GmbH, 68 Mannheim
Alle weiteren Chemikalien von Fa. E.Merck AG, 61 Darm -
stadt und Fa. Riedel de Haen, 3016 Seelze, Han.

1.3. Versuchstiere

Es wurden weibliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 170 und 190 g verwendet. Sie wurden von S. Ivanovas, Kißlegg geliefert. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter (Altromin R der Altromin GmbH, Lage) und Wasser. 7

Weibliche Kaninchen von etwa 3 kg Gewicht lieferte C. Mörder, Gottenheim a.K..

2. METHODEN

2.1. Bereitung der Medien für die Perfusion und Kultur

Die verwendeten Perfusionsmedien wurden unter Verwendung von Krebs - Henseleit Puffer (128) hergestellt. Für unsterile Perfusionen wurden die benötigten Mengen am Morgen des Versuchstags aus einem Konzentrat frisch hergestellt, sterile Lösungen wurden auf Vorrat für einige Tage bereitet.

Krebs - Henseleit Puffer (Konzentrat)

NaCl	82,53 g
KCl	4,20 g
KH_2PO_4	1,93 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	3,53 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Für die weiteren Verdünnungen wurde zweifach destilliertes Wasser aus einer Quarzanlage verwendet.

a) Medium Ia für die Vorperfusion in situ

KHP - Konzentrat	84,0 ml
NaHCO_3 - Lösung 1,3 %	161,0 ml
EGTA	190 mg
Glucose $\cdot \text{H}_2\text{O}$	1,09 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

b) Medium Ib für die Vorperfusion in situ

Ansatz wie Medium Ia, jedoch ohne EGTA

Medium Ib entspricht dem Krebs-Henseleit Puffer.

c) Waschpuffer

Ansatz wie Medium Ib, jedoch Zugabe
von 10,0 ml 0,3 M CaCl_2 - Lösung.

d) Perfusionsmedium für die rezirkulierende Perfusion
mit Collagenase.

Für die Perfusion wurden 65 ml eines Mediums eingesetzt, das aus Medium Ib und einer Lösung besonders gereinigten Albumins angesetzt wurde, die Endkonzentration des Albumins betrug 2,5 %. Nach 5 minütiger Vorperfusion wurden 0,3 M CaCl_2 -Lösung und Collagenase zugegeben, so daß die Endkonzentrationen 3 mM bzw. 0,05 % betrugen.

Reinigung des Albumins:

70 g Rinderserumalbumin wurden in 625 ml Wasser gelöst, 35 g nach (33) gereinigte, säuregewaschene Aktivkohle zugegeben, mit verdünnter HCl ein pH-Wert von 3 eingestellt und eine Stunde bei 4° C gerührt. Der größte Teil der Kohle ließ sich durch 25 minütiges Zentrifugieren bei 35 000 x g entfernen, letzte Reste wurden mit einer Filtration durch eine Seitz - Klärschicht beseitigt. Das p_H der klaren Lösung wurde mit verdünnter NaOH auf 7,4 eingestellt, und je 250 ml davon 3 mal je 24 Stunden gegen 10 l Krebs - Henseleit Puffer dialysiert.

Nach dem Bestimmen der Proteinkonzentration nach LOWRY (129) (Standard : Rinderserumalbumin) wurde

mit Medium Ib auf einen Gehalt von 6,5 % Albumin verdünnt. Zu je 100 ml dieser Lösung wurden noch 200 mg der Aminosäuremischung nach (34) und 283 mg Glucose-Monohydrat gegeben. Von dem fertigen Konzentrat wurden Portionen zu 25 ml tiefgefroren.

Wenn 25 ml des Albumin-Konzentrats mit Medium Ib auf 65 ml aufgefüllt wurden, betrug die Albuminkonzentration 2,5 %, die Glucose-Konzentration 5,5 mMol/l, und die Aminosäurekonzentrationen entsprachen den Angaben von (34).

Für sterile Perfusionen wurden dem Medium vor der Sterilfiltration noch 65 µl Penicillin-Streptomycin-Lösung (50 000 U/ml bzw. 50 mg/ml) zugesetzt.

e) Phosphate buffered saline (PBS) zum Spülen der Peritonealhöhle und der Lungen wurde nach Vorschrift von DULBECCO (130) angesetzt.

f) Medium für Hepatozytenkulturen.

Zur Kultivierung der Hepatozyten wurde Medium TC 199 mit 10 % fötalem Kälberserum eingesetzt. Das Serum wurde zur Inaktivierung des Komplementsystems 30 Minuten lang auf 56°C erhitzt. TC 199 (131) wurde in Pulverform geliefert und in doppelt quarzdestilliertem Wasser gelöst. Vor der Sterilfiltration wurden 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10^{-5} Mol/l Mercaptoäthanol zugegeben.

g) Medium für Kupfferzellkulturen

Für die ersten 24 Stunden Kultivationszeit bis zum Festsetzen der Zellen wurde Medium TC 199 mit 30 % hitzeinaktiviertem Kälberserum (64) verwendet, in der Folgezeit wurde der Serumanteil auf 10 % zurückgenommen. Die weiteren Zusätze entsprachen denen für das Hepatozyten-Medium.

2.2. Kombinierte Präparation von Hepatozyten und Sinusoidalzellen

Die Operationstechnik, Perfusionsverfahren und der Aufarbeitungsvorgang für Hepatozyten wurden von HOFMANN (32, 33) übernommen. Abbildung 3 fasst alle Schritte kurz zusammen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Hepatozyten in Krebs-Henseleit-Puffer resuspendiert, die Zellkonzentration wurde auf etwa 10 mg/ml eingestellt.

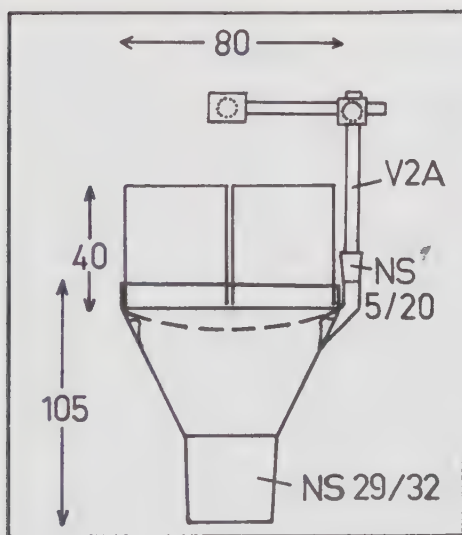
Der Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes, in dem etwa 80 % der gesamten Sinusoidalzellen enthalten waren, wurde in Portionen von 25 ml in verschraubbare 100 ml Erlenmeyerkolben abgefüllt, in die vorher 37,5 mg Pronase eingewogen worden waren. Nach gründlichem Begasen mit Carbogen wurden die Kolben 45 min im Inkubator bei 37°C geschüttelt. (100 Osz./min).

Anschliessend wurde 5 min bei 2000 upm (350 x g) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 50 ml Krebs-Henseleit-Puffer resuspendiert und 2 min bei 2000 upm (350 x g) zentrifugiert; dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Für weitere Verwendung wurden die Zellen in Krebs-Henseleit-Puffer in einer Konzentration von etwa 10 mg je ml aufbewahrt.

Zur Bestimmung Trypanblau-aufnehmender Zellen wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen einer 0,5 % Lösung von Trypanblau in 0,9 % NaCl versetzt, und eine Probe des Gemischs nach zwei Minuten unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 80 facher (Hepatozyten) oder 200 facher (Sinusoidalzellen) Vergrößerung betrachtet. Es wurden mindestens 300 Zellen ausgezählt.

2.3. Präparation von Hepatozyten für die Zellkultur

Das für die unsterile Präparation verwendete Verfahren konnte mit einigen Modifikationen übernommen werden. Für die Perfusion wurde ein Tisch aus Glas verwendet (Abb. 40), der autoklavierbar war. Oxygenator und Vorratsgefäß für das Perfusionsmedium wurden, gebrauchsfertig mit Silikonschläuchen verbunden, als Einheit autoklaviert. Der Silikonschlauch war so bemessen, daß er nicht nur an sämtliche Anschlüsse passte, sondern auch in die Peristaltikpumpe eingelegt werden konnte.



Abbildungung 40 : Perfusionstisch aus Glas und V2A-Stahl
für die Sterilpräparation von Hepatozyten

Für das Begasen der Medien mit Carbogen wurde ein Be-
steck aus zwei dünnen Pipetten, verbunden über ein
Y-Stück, mit vorgeschaltetem 0,22 μ m Sterilfilter, ver-
wendet.

Als Operationsfeld diente eine Hartgummiplatte, auf die
die Tiere mit Nadeln aufgespannt wurden.

Die verwendeten Medien waren im Voraus steril filtriert
worden. Es zeigte sich aber, daß ein wesentlich höherer
Prozentsatz trypanblauer Zellen erhalten wurde, wenn
die Medien älter als acht bis zehn Tage waren. Zur Fil-
tration wurde ein teflonbeschichteter Filterhalter aus

Edelstahl eingesetzt, nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Metallsinterplatte eines nichtbeschichteten Halters beim Autoklavieren zu viele lösliche Eisensalze abgab.

Die Medien wurden vor der Sterilfiltration 30 min lang mit Carbogen begast, und dann, falls nötig, auf p_H 7,40 eingestellt. Obwohl sich der p_H -Wert durch die Filtration ändert, ließ er sich durch 30 minütiges Begasen unmittelbar vor Gebrauch zuverlässig wieder einstellen.

Es erwies sich als notwendig, die Vorratsflaschen für die Medien zu "tyndallisieren", d.h. im Abstand von 24 bis 48 Stunden zweimal leer zu autoklavieren. Nach dem Einführen dieser Vorsichtsmaßnahme kam es nie mehr vor, daß der Inhalt einzelner Flaschen kontaminiert war.

Das Perfusionsmedium wurde aus fertig begastem, Ca^{++} -freiem Krebs-Henseleit-Puffer und der konzentrierten, tiefgefroren aufbewahrten Albuminlösung hergestellt. Das fertige Medium enthielt 2,5 % Albumin, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu g/ml$ Streptomycin, 5,5 mMol/l Glucose und Aminosäuren in den bei (34) angegebenen Konzentrationen. Das fertige Medium wurde unmittelbar vor Gebrauch steril filtriert.

Collagenase wurde kurz vor der Zugabe zur Perfusion in ca. 8 ml Perfusionsmedium gelöst, steril filtriert und ins Perfusionsmedium gegeben. Die Endkonzentration be-

trug 0,05 %. Die benötigte Menge 0,3 M CaCl_2 -Lösung wurde ebenfalls kurz vor Gebrauch steril filtriert. Ligaturen zum Befestigen der Braunüle in der Pfortader wurden in 70 % Ethanol aufbewahrt.

Die Flaschen mit fertig begastem Medium wurden mit käuflichen Infusionsbestecken versehen, diese wurden an ein metallenes Y-Stück angeschlossen, ein ca. 20 cm langer Silikonschlauch mit Luer-Kupplung diente als Endstrombahn zum Anschluß an die Braunüle. Besondere Sorgfalt wurde auf die blasenfreie Füllung der Schläuche verwendet. Das Perfusionsmedium wurde während der Vorbereitungs- und Operationszeit rezirkulierend durch den Oxygenator gepumpt, so daß es mit Carbogen ausreichend gesättigt wurde.

Präparation der Leber : Die Ratten wurden durch i.p. Injektion von Nembutallösung (50 mg / kg) betäubt. Sobald sie vollkommen relaxiert waren, wurde der gesamte Leib sorgfältig rasiert und mit Merfenlösung oder 70 % Ethanol desinfiziert. Nach dem Aufspannen auf dem Operationstisch wurde das gesamte Feld nochmals sorgfältig mit Ethanol benetzt.

Der erste Schnitt durchtrennte das Fell von der Leiste bis zum Hals, er wurde mit zwei Schnitten in der Lendengegend großzügig nach dorsal erweitert. Die Bauchmuskulatur wurde im linken unteren Quadranten durchtrennt, ein lateraler Schnitt führte bis zum kaudalen

Ende des Brustbeins. Auf der rechten Seite wurde bis zum Rippenbogen geschnitten, es entstand ein großer Muskellappen, der vorerst mit einer Nadel lose auf dem Tisch befestigt wurde.

Durch Verschieben der Därme wurde die Pfortader freigelegt und eine Ligatur darunter hindurchgezogen. Mit einer Braunüle wurde das Gefäß punktiert, nach Herausziehen des Mandrins das Infusionsbesteck mit laufendem Medium Ia angeschlossen. Die Assistenz eröffnete die Vena cava inferior. Nach dem Befestigen der Ligatur wurde die Braunüle mit zwei Nadeln so unterstützt, daß der ursprüngliche Verlauf der Pfortader weitgehend erhalten blieb.

Während das Medium, das unter einem Druck von ca. 40 cm Wassersäule stand, die Leber durchströmte, wurde das Organ freipräpariert. Der Magen-Darm-Trakt wurde mobilisiert, die Venae hepaticae durchtrennt, die Pfortader ganz freigelegt.

Die Muskelschicht der rechten Thoraxhälfte wurde abgelöst, es entstand mit der Bauchmuskulatur ein großer steriler Lappen, der mit zwei Nadeln weit ausgespannt wurde. Das so erhaltene sterile Feld erleichterte das Umlagern der Leber.

Nach dem Durchtrennen des Zwerchfells wurden die Rippen in weitem Bogen herausgeschnitten, ohne jedoch die Lungen zu verletzen. Der Ösophagus wurde freigelegt und alle noch verbliebenen Verbindungen zwischen Leber und

Körper gelöst. Vorsichtig wurde die Leber mit Hilfe eines Uhrglases auf den Perfusionstisch überführt.

Es ist für den Erfolg der Präparation wichtig, daß der Magen-Darm-Trakt unversehrt bleibt. Da die Freilegung des Ösophagus technisch nicht ganz einfach ist, wurde er anfänglich durchtrennt. Es gab jedoch so oft Kontaminationen, daß die zusätzlichen Handgriffe in Kauf genommen werden mußten. Hingegen war es nicht nötig, die Operation in der beengenden sterilen Werkbank auszuführen. Es konnte im offenen Raum gearbeitet werden, allerdings unter striktester Beachtung der Regeln sterilen Arbeitens.

Nach Anschluß der Leber an die rezirkulierende Perfusion wurde 5 min lang mit Ca^{2+} -freiem Medium vorperfundiert. Erst nach dieser Behandlung, die eine Trennung der Desmosomen bewirkt (35), wurde sterilfiltrierte Collagenase- und CaCl_2 -Lösung zugesetzt und noch 25 min weiterperfundiert. Die Leber wurde in 75 ml Krebs-Henseleit-Puffer von der Glisson-Kapsel befreit und vorsichtig zerschüttelt. Nach Filtration durch ein Nylonsieb (Maschenweite $79\ \mu\text{m}$) wurde die ockerfarbene Zellsuspension auf die Zentrifugenbecher verteilt.

Die erste Zentrifugation bei 600 upm ($37 \times g$) dauerte 2 min, das Sediment wurde noch zweimal resuspendiert und je 2 min bei 400 upm ($14 \times g$) zentrifugiert.

Für den letzten Zentrifugationsschritt und für die weitere Verwendung wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert. In der fertigen Zellsuspension wurde die Zellkonzentration auf etwa 10 mg / ml (entsprechend $1,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml) eingestellt und der Anteil trypanblauer Zellen ermittelt.

Wie auf S.22 ff begründet, wurden 3 ml Zellsuspension auf eine 60 mm Kulturschale gegeben. Der erste Medienwechsel fand nach 3 Stunden statt, die folgenden im Abstand von 24 Stunden. Beim Auftrag auf die Kulturgefäße wurde sorgfältig auf waagerechten Stand der Schalen und auf gleichmässige Verteilung der Zellen geachtet. Andernfalls bildeten sich - besonders an den Plattenrändern - Bereiche zu hoher Zelldichte, dort starben die Hepatozyten schnell ab.

2.4. Präparation von Sinusoidalzellen für die Kultur

Die Freipräparation der Leber erfolgte, wie schon bei der Hepatozytenbereitung beschrieben. Nach dem Punktieren der Pfortader wurde aber nur kurz mit EGTA-haltigem Medium Ia perfundiert, dann wurde kurz mit Waschmedium nachgespült und der Zufluß abgestellt. Innerhalb von 2 min wurden 10 ml 0,2 % Pronaselösung in die Braunüle injiziert. Während der weiteren Präparation war weiterhin jeder Mediumfluß abgestellt,

so daß die Pronase etwa fünf Minuten auf das Gewebe einwirken konnte. Abschliessend wurde die Leber kurz mit Waschmedium durchspült, um Blutreste aus dem Gefäßsystem und von der Oberfläche fortzuwaschen. Dieser Schritt ergab eine deutliche Verminderung der Erythrozytenzahl in der fertigen Zellpräparation.

Die Leber wurde in 60 ml 0,2 % Pronaselösung mit zwei Pinzetten von der Kapsel befreit und in möglichst kleine Stücke zerpfückt, sie war durch die injizierte Pronase schon sehr weich geworden. Der Gewebsbrei wurde in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Carbogen begast, dann 45 min lang bei 37 °C mit einem Magnetrührer bei 200 upm gerührt. Bindegewebsreste wurden mit dem 79 µm Sieb abfiltriert, die Suspension wurde 5 min lang bei 2000 upm (350 x g) zentrifugiert. Anschliessend wurde das Sediment zweimal in je 50 ml Waschmedium resuspendiert und 2 min bei 2000 upm zentrifugiert. Die Drehzahl konnte bei Bedarf auf 2500 upm gesteigert werden.

Nach einem letzten Resuspendieren und Zentrifugieren in 30 ml Kulturmedium wurde das Pellett mit 10 ml Kulturmedium aufgenommen und ein Aliquot mit 0,25 % Trypanblau ausgezählt.

Im Allgemeinen wurde die Zellkonzentration auf $8 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt, und 3 ml der Suspension auf eine 60 mm Kulturschale gegeben. Der erste Medienwechsel

erfolgte nach 24 Stunden, dabei wurden lose Zellen und Trümmer mit Medium TC 199 abgespült. Später wurde das Medium jeden zweiten Tag gewechselt.

Zur Bestimmung phagozytierender Zellen wurden Kohle- oder $1\text{ }\mu\text{m}$ große Latexpartikel zugegeben. Die käufliche Rußdispersion C 11-1431a wurde mit 0,9 % NaCl 10 fach verdünnt, die Latexsuspension des Handels wurde auf eine Teilchenzahl von $4 \cdot 10^8$ je ml eingestellt. Gab man davon 50 μl zu einer Platte mit $1,5 - 2,0 \cdot 10^6$ Zellen, so entfielen auf jede Zelle 10 bis 15 Partikel, die nach Phagozytose deutlich im Zellinneren zu erkennen waren. Die Auszählung phagozytierender Zellen erfolgte nach wenigstens 4 stündiger Inkubation.

2.5. Gewinnung von aktivierten und nichtaktivierten Alveolarmakrophagen

Die Zellen wurden aus den Lungen von 2,5 bis 3,5 kg schweren weiblichen Kaninchen gewonnen. Zur Aktivierung der Zellen wurde 27 Tage vor der Präparation eine Emulsion aus gleichen Teilen von Freund's vollständigem Adjuvans und 0,9 % NaCl in die Ohrvene gespritzt (Dosis 0,5 ml je kg Körpergewicht).

Zur Gewinnung der Makrophagen wurden die Tiere durch Injektion von Luft in die Ohrvene getötet. Neben einem raschen und schmerzlosen Tod wurde damit auch eine weitgehende Blutleere in den Lungengefäßen erreicht.

Sämtliche Organe des Thorax wurden im Paket freipräpariert, anschliessend wurden von diesem Paket das Herz und alle großen Gefäße sowie Blutreste sorgfältig entfernt. Dieser Schritt senkte die Verunreinigung der Zellen mit Erythrozyten deutlich. Die Trachea wurde so fest wie möglich mit einer Braunüle verbunden, mit Hilfe einer Antlia-Spritze mit Dreivegehahn wurde die Lunge mit 3 x 100 ml PBS gespült.

Die Zellen wurden durch 3 minütige Zentrifugation bei 2000 upm (350 x g) vom PBS abgetrennt, zum Äquilibrieren in Medium TC 199 mit 30 % FKS aufgenommen, nochmals zentrifugiert, und wieder in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde auf 10 mg / ml gebracht, eine Kulturschale von 60 mm Durchmesser wurde mit 3 ml der Suspension beschickt.

Da die Präparation nicht steril ausgeführt werden konnte, wurde nach dem Medienwechsel (3 h nach Aussaat) mit den Versuchen begonnen. Die Reinheit der Kulturen wurde durch Kohle- und Latexpheagozytose überprüft, sie lag stets über 99 %.

2.6. Gewinnung von Peritonealgranulozyten und Knochenmarks- makrophagen

Beide Zellarten wurden freundlicherweise im Labor von Dr. Munder (MPI für Immunbiologie) für uns präpariert. Die Gewinnung der Peritonealgranulozyten erfolgte 24 h nach i.p. Injektion von Lysolecithin nach einer Hausvorschrift.

Die Knochenmarksmakrophagen wurden nach Hausvorschriften aus den Femures von Mäusen gewonnen. Die aus dem Knochenmark erhaltenen Zellen wurden 12 Tage lang in Dulbeccos MEM mit 10 % FKS, 5 % Pferdeserum und 30 % über L929-Fibroblasten konditioniertem Dulbecco-MEM kultiviert.

2.7. Bestimmung der intrazellulären Na^+ - und K^+ - Konzentration in Hepatozyten.

Die Versuche wurden mit Suspensionen von ca. 10 mg/ml Hepatozyten in Krebs-Henseleit Puffer durchgeführt, je ein Milliliter Zellsuspension wurde in einem 25 ml-Plastikfläschchen mit Carbogenatmosphäre bei 37°C im Schüttelinkubator (Frequenz 100 min⁻¹) inkubiert. Für jeden Meßpunkt mußte eine Inkubation mit ¹⁴C-Dextran und ³HHO zur Bestimmung des Intrazellulärtraumes und des mitgerissenen Mediums erfolgen sowie eine Inkubation ohne Marker zur Elektrolytmessung.

Aus jeder Probe wurden Volumenwerte dreifach, Elektrolytwerte doppelt bestimmt. Für jeden Wert wurde ein Polyethylen-Zentrifugenröhrchen mit 70 µl Silikonöl AR 100 und 3 M Trichloressigsäure beschickt (30 µl für Radioaktivitätsmessungen, 50 µl für Elektrolytbestimmungen), vgl. Abb. 41. Kurzes Vorzentrifugieren ergab eine saubere Trennung der Schichten.

Kurz vor Ende der vorgesehenen Inkubationszeit wurde den Proben für die Volumenbestimmung 10 µl ³HHO (ca. 300 µCi/ml) und 20 µl ¹⁴C-Dextranlösung (ca. 10 µCi/ml) zugefügt, die restlichen Proben erhielten dasselbe Volumen Puffer. Damit wurde sichergestellt, daß kein Abbau des Dextrans zu kleinen, permeablen Molekülen erfolgen konnte. Die gleichmäßige Verteilung des Tritiumwassers erfolgt dagegen in wenigen Sekunden.

Nun wurden 200 µl Zellsuspension auf die Silikonölschicht gegeben, und die Zentrifuge gestar-

tet. Die rasche Beschleunigung auf ca. 13 000 x g ließ die Zellen in wenigen Sekunden durch die Ölschicht wandern, so daß sie durch die Säure aufgeschlossen werden konnten.

a) Bestimmung des intra- und extrazellulären Volumens:
Nach dem Zentrifugieren wurden vom Medium über der Ölschicht 20 µl gezählt. Das Sediment wurde als Ganzes gezählt, dazu wurde die Spitze des Zentrifugenröhrchens noch in der Ölschicht abgeschnitten und direkt zu 10 ml Bray-Szintillator (132) gegeben.

Die Zählung erfolgte im Tricarb 3380 mit angeschlossenem, vorher geeichtem Absolute Activity Analyzer AAA 544. Man erhielt damit die ^{14}C - und ^3H -Aktivitäten in dpm von Medium und TCA-Aufschluß.

Dann seien : MED_C bzw. MED_T die ^{14}C bzw. Tritiumaktivität der Mediumprobe, V_M ihr Volumen.
 TCA_C bzw. TCA_T die ^{14}C - bzw. Tritiumaktivität im TCA-Aufschluß.

Gesucht wird: V_Dex = Dextranraum $\hat{=}$ Extrazellulärraum

V_T = Tritiumraum = Extra- plus Intrazellulärraum.

V_i = Intrazellulärraum = $V_\text{Dex} - V_\text{T}$

Dann ist : $V_\text{Dex} = \text{TCA}_\text{C} : \frac{V_\text{M}}{\text{MED}_\text{C}}$

$V_\text{T} = \text{TCA}_\text{T} \cdot \frac{V_\text{M}}{\text{MED}_\text{T}}$

Durch Subtraktion von V_DEX von V_T ergibt sich V_i .

b) Bestimmung der Elektrolytkonzentrationen:

Die Bestimmung erfolgte flammenphotometrisch. Als Standard diente eine Lösung, die 0.1 mMol/l NaCl und KCl enthielt. Alle Verdünnungen wurden mit doppelt quarzdestilliertem Wasser hergestellt.

Vom über der Ölschicht verbliebenen Medium wurde ein Aliquot 225fach für die Na^+ -Bestimmung verdünnt, ein weiteres für die K^+ -Messung nur 75fach. Aus dem TCA-Aufschluß wurden 2 mal je 20 μl 750 fach verdünnt, in allen Proben die Na^+ und K^+ Gehalte gemessen.

Dann seien: MED_{Na} und MED_{K} sowie TCA_{Na} und TCA_{K} die im Medium bzw. im TCA-Aufschluß gemessenen Na^+ - und K^+ -Konzentrationen in mMol/l, V_{TCA} das Gesamtvolumen des TCA-Aufschlusses.

Gesucht ist: Na_i^+ die intrazelluläre Na^+ Konzentration

K_i^+ die intrazelluläre K^+ Konzentration

Dann ist :

$$\text{Na}_i^+ = \frac{\text{TCA}_{\text{Na}} \cdot V_{\text{TCA}} - \text{MED}_{\text{Na}} \cdot V_{\text{Dex}}}{V_i}$$

$$\text{K}_i^+ = \frac{\text{TCA}_{\text{K}} \cdot V_{\text{TCA}} - \text{MED}_{\text{K}} \cdot V_{\text{Dex}}}{V_i}$$

Das Volumen des TCA-Aufschlusses V_{TCA} setzte sich zusammen aus 50 μl ins Zentrifugenröhrchen pipettierter TCA plus dem errechneten Tritiumraum V_{T} .

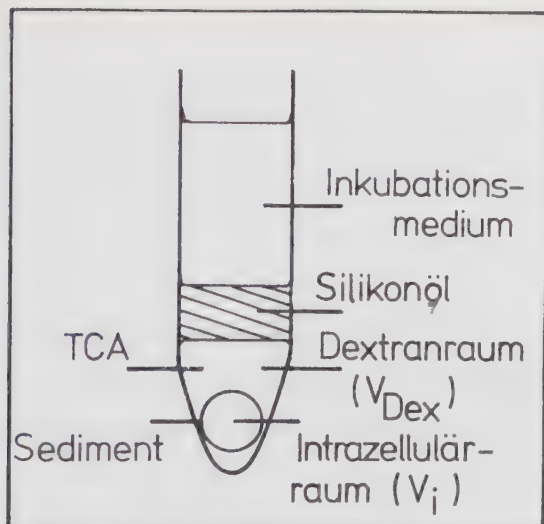


Abb. 41 : Silikonölfiltration : Darstellung der Probenröhrchen und Definition der Räume

$$V_{\text{Dex}} = \text{Dextranraum} \quad V_i = \text{Intrazellulärraum}$$

$$V_T = \text{Tritiumraum} = V_{\text{Dex}} + V_i$$

2.8. Bestimmung von Metaboliten

2.8.1. Probenvorbereitung bei Einzelzellen

Hier handelte es sich um Suspensionen von Sinusoidalzellen oder Alveolarmakrophagen. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde im Eppendorf-Cup 1 min bei 11 000 x g zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde abgesaugt, er konnte zur Messung von Enzymaktivitäten im Medium benutzt werden. Das Sediment wurde mit eiskalter, 0,8 M HClO_4 (meist 200 μl) versetzt und im Potter-Elvehjem-Homogenisator bei 600 upm kurz homogenisiert. Nach Abzentrifugieren des Proteins wurde der Überstand mit festem KHCO_3 vorsichtig neutralisiert. Zur besseren Fällung

des KClO_4 wurde die Probe für 10 min in Eis gestellt, dann nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Bestimmung von ATP, UTP, UDPG und Σ UMP verwendet.

2.8.2. Probenvorbereitung von Zellkulturen

Von den Kulturschalen wurde das Medium vollständig abgesaugt, der Zellrasen mit 0,9 % Kochsalzlösung gespült, endlich wurden alle Flüssigkeitsreste sorgfältig entfernt. Nach Verteilung von 500 μl 0,8 M HClO_4 auf der Platte wurde diese mit dem Boden kurz in flüssigen Stickstoff getaucht, dann wurde mit 100 mg festem KHCO_3 neutralisiert. Flüssigkeit und feste Bestandteile wurden mit einem Gummischaber sorgfältig zusammengekratzt und in ein Eppendorf-Cup umgefüllt. Nach dem Abzentrifugieren der Feststoffe wurde der Überstand in die Tests eingesetzt. Wenn gelegentlich nur Verbindungen, die in relativ hohen Konzentrationen vorlagen (z.B. ATP) gemessen werden sollten, eine größere Verdünnung des Aufschlusses also toleriert werden konnte, wurden statt festem KHCO_3 300 μl einer gesättigten, etwa 2,2 M Lösung dieses Salzes zur Neutralisation verwendet.

2.8.3. Bestimmung von Adenosin-5'-triphosphat (ATP)

ATP wurde nach (133) mit Hilfe von Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bestimmt.

Puffergemisch :	TRA • HCl	pH 7,5	50 mM
	Mg(CH ₃ COO) ₂	• 4 H ₂ O	5 mM
	EDTA		0,5 mM
	NADP ⁺		1,6 mM
	Glucose		14 mM

NADP⁺ und Glucose wurden erst unmittelbar vor dem Test im Puffergelöst.

Testansatz :	Puffergemisch	200 µl
	Probe	400 µl
	G-6-PDH	5 µl

Starten mit 5 µl Hexokinase

Meßstrahlung 334 nm

2.8.4. Bestimmung von Uridin-5'- diphosphat-glucose (UDPG) und Uridin-5'-triphosphat (UTP)

Beide Verbindungen konnten nach KEPPLER et al. (134, 135) in einem Ansatz gemessen werden, die Extinktionsdifferenz bei 334 nm nach UDPG-DH Zugabe war Maß für den UDPG-Gehalt, die Differenz nach Zugabe von UDPG-P Maß für den UTP-Gehalt der Probe.

Puffergemisch :	Glycin-KOH	P _H 8,7	500 mM
	EDTA		10 mM
	NAD ⁺		3 mM

G-1-P-Lösung : G-1-P 100 mM
 Mg(CH₃COO)₂·4 H₂O 1 mM

G-1-P und NAD⁺ wurden erst kurz vor dem Test gelöst.

Testansatz :	Puffergemisch	450	μl
	Probe	100	μl
	UDPG-DH	10	μl
	G-1-P-Lösung	20	μl
	UDPG-P	5	μl

Meßstrahlung 334 nm

2.8.5. Bestimmung der säurelöslichen Uracilnucleotide als UMP (Σ UMP)

Das Prinzip des Tests besteht darin, die säurelöslichen Uracilnucleotide mit Phosphodiesterase zu UMP zu hydrolysieren, welches dann nach (136) bestimmt wird.

Durchführung der PDE-Hydrolyse :

Hydrolysepuffer :	Tris-HCl	p _H 8,9	200 mM
	Mg (CH ₃ COO) ₂ ·4 H ₂ O		1 mM
Hydrolysenansatz :	Puffer		200 μl
	Probe		200 μl
	PDE		10 μl

Das Gemisch wurde in einem fest verschraubbaren Reagenzglas 15 min bei 37°C inkubiert, anschliessend die PDE durch 8 minütiges Erhitzen auf 100°C zerstört.

Bestimmung des entstandenen UMP :

Puffergemisch: Glycin-KOH	p _H 8,7	500 mM
Mg	(CH ₃ COO) ₂ · 4 H ₂ O	5 mM
EDTA		0,5 mM
NAD ⁺		2,5 mM
G-1-P		2 mM
ATP		3 mM
UDPG-P und NDPK	je	20 µg/ml
UDPG-DH		150 µg/ml
Testansatz :	Puffergemisch	500 µl
	PDE-Hydrolysat	100 µl

Start mit 10 µl NMPK

Meßstrahlung 334 nm

2.8.6. Harnstoffbestimmung

Im Medium der Hepatozytenkulturen wurde der Harnstoff durch Ureasespaltung und anschliessende Bestimmung des freigesetzten Ammoniaks mit Hilfe der Berthelot-Reaktion nach FAWCETT und SCOTT (137) gemessen. Die Reagentien dazu wurden als fertiger Satz von Boehringer bezogen. Aus dem Kulturmedium wurden zu den gegebenen Zeiten 100 µl entnommen und direkt in den Test eingesetzt. Da für diese Versuche serumfreies Medium verwendet wurde, konnte auf eine Enteiweissung der Probe verzichtet werden. Die Hydrolyse und die Messung des gebildeten Farbstoffs bei 546 nm erfolgten nach den Vorschriften des Reagentiensatzes.

2.9. Messung von Enzymaktivitäten

Als Probelösungen dienten entweder die zellfreien Überstände nach Zentrifugation (s. 2.8.1.) oder Homogenate der Zellsedimente in 0,1 % Triton-X-100.

2.9.1. Glutamat - Dehydrogenase (GldH)

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte nach (138), es wurde bei 334 nm gemessen.

Puffergemisch :	TRA.HCl	p _H 8,0	35 mM
	CH ₃ COO.NH ₄		50 mM
	EDTA		10 mM
	ADP		50 mM
	NADH ⁺		5 mM

α -Ketoglutaratlösung : 0,57 M

Testansatz :	Puffergemisch	500 μ l
	Probe	100 μ l

Start mit 20 μ l α -Ketoglutaratlsg.

Zellhomogenate wurden zwei- bis vierfach verdünnt in den Test eingesetzt, damit die Reaktion nicht zu schnell ablief.

2.9.2. Lactatdehydrogenase (LDH)

Die Bestimmung erfolgte nach (139), es wurde bei 334 nm gemessen. Zellhomogenate wurden 5 bis 10 fach verdünnt in den Test eingesetzt.

Testansatz : K-P _i -Puffer	p _H 7,5	100 mM
Na-Pyruvat		4 mM
NADH		0,5 mM

Testansatz : Puffergemisch	500 µl
Probe	100 µl

7

2.10. Proteinbestimmungen

Gewöhnlich wurde Protein nach LOWRY (129) gemessen, wenn jedoch nur wenig Substanz vorhanden war, wie zum Beispiel bei Kupfferzellkulturen, wurde mit Coomassie-Brilliant Blau nach BRADFORD (140) gearbeitet.

2.10.1. Bestimmung nach LOWRY

Die Probelösungen enthielten zwischen 20 und 200 µg/ml Protein, als Standard diente Rinderserumalbumin.

Reagenz: Unmittelbar vor dem Versuch wurden gemischt:

50 ml 0,1 M NaOH mit 2 % Na₂CO₃

1 ml 0,5 % CuSO₄/ 1 % Na-Citratlösung

Testansatz: Reagenzlösung :	2,0 ml
-----------------------------	--------

Probe	100 µl
-------	--------

Nach 20 min Stehen bei Raumtemperatur wurden 200 µl Folin-Ciocalteus-Reagenz zugegeben, 60 min bei 37°C inkubiert und bei 578 nm abgelesen.

2.10.2. Bestimmung nach BRADFORD

Reagenzlösung :	100 mg Coomassie Brilliant Blau
	50 ml Ethanol 95 % (v/v)
	100 ml Phosphorsäure 85 Gew. %
	ad 1000 ml mit destilliertem Wasser

Testansatz: Reagenzlösung	2,0 ml
Probe	100 µl

Der Ansatz wurde gut gemischt und die Extinktion bei 578 nm nach 10 min abgelesen. Daneben wurde jedesmal eine Standardkurve mit Rinderserumalbumin angelegt.

7

2.11. DNS - Bestimmung

Die DNS - Bestimmung erfolgte aus Zellhomogenaten : nach CERIOTTI (141) und wurde freundlicherweise von Frau S. Becher von der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg übernommen.

2.12. Peroxidase - Färbungen

Der Nachweis von Peroxidase in Kupfferzellen gestaltete sich schwierig, da zunächst unter Bedingungen, die mit den Leukozyten von Blutaussstrichen gute Resultate erbrachten, kultivierte Kupfferzellen keinerlei Färbung aufwiesen. Dagegen färbten sich in Ausstrichen frisch präparierter Sinusoidalzellen wenigstens ein geringer Teil der Zellen an. Die Beobachtung, daß kultivierte Kupfferzellen sich nicht auf Peroxidase anfärben liessen, machten auch andere Arbeitsgruppen (D.L.Knock, persönl. Mitteilung).

Auch die Verwendung anderer Substrate brachte zunächst keine Änderung, wir untersuchten Benzidin, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), o-Dianisidin, o-Tolidin und Guaja-

col. Dagegen gelang es, an unfixierten Kupfferzellkulturen durch 30 min Inkubation bei 37°C mit dem bei VAN BERKEL (142) angegebenen System (0,1 M K-Na-Phosphat p_H 7,4 mit 0,1 % DAB und 0,03 % H_2O_2) in mehr als 90 % der Zellen Peroxidase nachzuweisen.

2.13. Hormonbindungsversuche

2.13.1. Reinigung von ^{125}J -Insulin an Sephadex G 50

Das käufliche ^{125}J -Insulin wurde an einer Sephadex G 50 Säule (1 x 75 cm) bei 4°C von Aggregaten höheren Molekulargewichts und von ^{125}J odid gereinigt. Als Elutionspuffer diente TC 199, so daß das gereinigte ^{125}J -Insulin sofort für die Bindungsstudien zur Verfügung stand. Das Dextrangel war vor Inbetriebnahme der Säule mit Rinderserumalbumin und einer grösseren Menge nichtmarkierten Insulins vorbehandelt worden, um unspezifische Bindung zu reduzieren. Bei Nichtgebrauch der Säule wurde diese mit einer Lösung von 0,05 % Thiomerosal = Äthylmercurithiosalicylsäure-Natriumsalz in TC 199 durchgespült. Dies ist dasselbe Bakteriostatikum, das auch zur Konservierung des ^{125}J -Insulins vom Hersteller benutzt wird. Vor Wiederbenutzung der Säule wurde unter Kontrolle mit dem Durchflußphotometer das Bakteriostatikum mit reinem TC 199 ausgewaschen.

2.13.2. Hormonbindung an Zellkulturen

Für die Inkubationen wurden Lösungen der Hormone in Kulturmedium vorbereitet. Der Versuch wurde gestartet durch vollständiges Absaugen des alten Mediums und Aufbringen der hormonhaltigen Medien. Platten für die Versuche bei 4°C wurden rechtzeitig zum Abkühlen in den Kühlraum gebracht.

Nach den vorgesehenen Zeiten wurde das Medium abgezogen und in Eppendorf-Cups kalt gestellt, um später für die Bestimmung der Abbaurate verwendet zu werden. Der Zellrasen wurde dreimal kurz mit kalter 0,9 % NaCl-Lösung gespült, nach jedem Spülgang wurde die Flüssigkeit so sorgfältig wie möglich entfernt. Dann wurden die Zellen mit 300 µl 0,2 % Digitoninlösung (für Insulinbindungsstudien) oder 300 µl Wasser (für Glucagonversuche) lysiert, mit einem Gummischaber von der Platte abgekratzt und in ein Eppendorf-Cup umgefüllt. Dieses wurde sofort 2 min lang bei 11000 x g zentrifugiert. Der gesamte Vorgang dauerte etwa 3 min und wurde im Kühlraum durchgeführt.

Mit einer feinen Spritze wurden die Überstände entfernt und mit 5 ml Szintillator in ein Zählglas überführt. Die Sedimente wurden mit 100 µl NCS Tissue Solubilizer aufgelöst, mitsamt der Spitzen der Eppendorf-Cups abgeschnitten und mit 5 ml Szintillator ausgezählt. Das Zählen besorgte der PRIAS PL mit einem für ¹²⁵J vorbereiteten Programm.

2.13.3. Bestimmung des Insulinabbaus

Die Messungen wurden mit dem Medium der Bindungsversuche vorgenommen. In einem Eppendorf-Cup wurden gemischt: 100 μ l Probe + 100 μ l 10^{-6} M Insulinlösung als Träger + 100 μ l 20 % TCA. Nach 10 min Stehenlassens in Eis wurde zentrifugiert, der Überstand sorgfältig abgesaugt, nochmals zentrifugiert und letzte Flüssigkeitsreste entfernt. Das Sediment wurde in 100 μ l NCS Tissue Solubilizer gelöst, mitsamt der Spitze des Eppendorf-Cups abgeschnitten und mit 5 ml Szintillator nach sorgfältigem Mischen ausgezählt.

2.13.4. Bestimmung des Glucagonabbaus durch SDS-Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Die Messungen wurden mit dem Medium der Bindungsversuche vorgenommen. Für Glucagon und die zu erwartenden niedermolekularen Abbauprodukte werden hochprozentige Gele benötigt, um befriedigende Trennleistungen zu erzielen. In Vorversuchen wurden die besten Ergebnisse mit einem 20 prozentigen Gel erzielt. Es wurde eine analytische Apparatur von Buchler verwendet.

Stammlösungen: a)	Acrylamid	30,0 g
	Bisacrylamid	800 mg
	Wasser	ad 100 ml
b)	Tris	36,3 g
	SDS	800 mg
	Wasser	ad 200 ml, pH 8,8

Lösung c)	Tris	6,0 g
	SDS	400 mg
	Wasser	ad 100 ml
	p_H	6,8

Für die Gele wurden gemischt: (143,144)

Trenngel :	Lösung a	32 ml
	Lösung b	12 ml
	Wasser	4 ml
	$(NH_4)_2S_2O_8$ 10%	240 μ l
	TEMED 10 %	240 μ l

Sammelgel:	Lösung a	3 ml
	Lösung c	5 ml
	Wasser	12 ml
	$(NH_4)_2S_2O_8$ 10 %	60 μ l
	TEMED 10 %	200 μ l

Elektrophoresepuffer:

Tris	60,0 g
Glycin	288,0 g
SDS	20,0 g
Wasser	ad 2000 ml p_H 9,2

Vor Gebrauch 1 + 9 mit Wasser verdünnen.

Probenpuffer:	SDS Lösung 10 %	15,0 ml
	Lösung c	6,25 ml
	Mercaptoäthanol	2,5 ml
	Bromphenolblau 0,05 %	1,0 ml
	Glycerin 10 %	5,0 ml
	Wasser	ad 50 ml

Polymerisation: In Glasröhrchen (Innenmasse 0,4 x 7 cm) wurde 1,0 ml der fertigen Trenngelmischung gefüllt, mit 0,1 ml Wasser überschichtet. Nach einer Polyme-

risationszeit von mindestens 30 min wurde das Wasser mit einem Filterpapierstreifen entfernt, statt dessen 200 μ l Sammelgel-Mischung einpipettiert, und diese wiederum mit Wasser überschichtet. Nach 20 min Polymerisationszeit waren die Röhrchen gebrauchsfertig.

Elektrophorese: 100 μ l Probe wurden mit 100 μ l Probenpuffer gemischt und auf das Sammelgel gegeben. Während des Wanderns der Probe durch das Sammelgel wurde mit 1 mA je Röhrchen gefahren, später mit 3 mA je Gel, bis die Phenolrotbande fast das untere Ende erreicht hatte. Phenolrot lief stets etwas schneller als Bromphenolblau und wurde daher als Markierung der Frontlinie benutzt.

Die recht spröden Gele liessen sich leicht aus den Röhrchen entfernen, wenn man sie im Gefrierfach des Kühlschranks kurz unter 0° C abkühlte, mit einer dünnen Kanüle etwas Puffer an der Seite einspritzte und dann das Gel mit dem Kolben einer Tuberkulinspritze herausdrückte.

Nach dem Ausmessen des Trenngels und der Farbstofffronten wurde es in ca. 2 mm dicke Scheibchen geschnitten. Jedes Scheibchen wurde mit 200 μ l einer 10 % Lösung NCS Tissue Solubilizer in Wasser in einem Zählfläschchen 1 Stunde bei 37 °C extrahiert, dann wurden 5 ml Szintillator zugegeben und im PRIAS PL gezählt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Wisse, E., Med.Chir.Dig. 6, 409 - 418 (1977)
2. Hofmann, F., Wagle, S.R., Decker, K., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1395 - 1400 (1976)
3. Weibel, E.R., Stäubli, W., Gnägi, H.R., Hess, F.A., J.Cell Biol. 42, 68 - 91 (1969)
4. Seglen, P.O., Exp.Cell Res. 82, 391 - 398 (1973)
5. Blouin, A. in : Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells (Hrsg. E. Wisse und D.L. Knook), Elsevier/North Holland, 61 - 72 (1977)
6. Knook, D.L., Sleyster, E.C., Exp. Cell Res. 99, 444 - 449 (1976)
7. Wisse, E., J. Ultrastruct. Res. 38, 528 - 540 (1972)
8. Widmann, J.J., Cotran, R.S., Fahimi, H.D., J.Cell Biol. 52, 179 - 188 (1972)
9. Wisse, E., van't Noordende, J.M., van der Meulen, J., Daems, W.T., Cell Tiss. Res. 173, 423 - 435 (1976)
10. Sandstrom, B., Exp. Cell Res. 37, 552 - 561 (1965)
11. Jacob, S.T., Bhargava, P.M., Exp.Cell Res. 27, 453 - 467 (1962)
12. Anderson, N.G., Science 117, 627 - 629 (1953)
13. Rappaport, C., Howze, G.B., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 121, 1010 - 1015 (1966)
14. McLimans, W.F., Mount, D.T., Bogitch, S., Crouse, E.J., Harris, G., Moore, G.E., Ann. N.Y. Acad. Sci. 139, 190 - 213 (1966)

15. Howard, R.B., Christensen, A.H., Gibbs, F.A.,
Pesch, L.A., J. Cell Biol. 35, 675 - 673 (1967)
16. Howard, R.B., Lee, J.C., Pesch, L.A., J. Cell Biol.
57, 642 - 658 (1973)
17. Fry, F.J., Jones, C.A., Wiebkin, P., Bellemann, P.
Bridges, J.W., Anal. Biochem. 71, 341 - ~~350~~ (1976)
18. Berry, M.N., Friend, D.S., J. Cell Biol. 43, 506 -
520 (1969)
19. Berry, M.N., Meth. Enzymol. 32, 625 - 632 (1974)
20. Seglen, P.O., Exp. Cell Res. 76, 450-454. (1972)
21. Seglen, P.O., Exp. Cell Res. 76, 25 - 30 (1973)
22. Ingebretsen, W.R., Wagle, S.R., Biochem. Biophys.
Res. Comm. 47, 403 - 410 (1972)
23. Munthe - Kaas, A.C., Seglen, P.O., FEBS lett. 43,
252 - 256 (1974)
24. Rous, P., Beard, J.W., J. Exp. Med. 59, 577 - 594
(1934)
25. Wattiaux, R., Baudhuin, R., De Duve, C., Biochem. J.
63, 608 - 617 (1956)
26. Knook, D.L., Blansjaar, N., Sleyster, E.Ch., Exp.
Cell Res. 109, 317 - 329 (1977)
27. Deschenes, J., Lafleur, L., Marceau, N., Exp. Cell
Res. 103, 183 - 190 (1976)
28. Mills, D.M., Zucker - Franklin, D., Am. J. Path. 54,
147 - 155 (1969)
29. Nomoto, M., Yoshiko, N., J. Biochem. (Jap.) 46, 653 -
660, (1959)

30. Berg, T., Boman, D., Biochim. Biophys. Acta 321, 585 - 596 (1973)
31. Lentz, P.E., DiLuzio, N.R., Exp. Cell Res. 67, 17 - 26 (1971)
32. Hofmann, F., Wilkening, J., Nowack, J., Decker, K., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 427 - 433 (1976)
33. Hofmann, F., Dissertation, Med. Fak. Univ. Freiburg, (1979)
34. Schimassek, M., Gerok, W., Biochem. Z. 343, 407 - 415 (1965)
35. Drochmans, P., Wanson, J.G., Mosselmans, R., J. Cell Biol. 66, 1 - 22 (1975)
36. Hofmann, F., Decker, K., Biochem. Soc. Trans. 3, 1084 - 1086 (1975)
37. Wagle, S.R., Hofmann, F., Decker, K., Biochem. Biophys. Res. Comm. 71, 857 - 863 (1976)
38. Wagle, S.R., Ingebretsen, W.R., Meth. Enzymol. 35, 579 - 596 (1975)
39. Quistorff, B., Bondesen, S., Grunnet, N., Biochim. Biophys. Acta 320, 503 - 516 (1973)
40. Baur, H., Kasperek, S., Pfaff, E., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 827 - 838 (1975)
41. Wagle, S.R., Stermann, R., Decker, K., Biochem. Biophys. Res. Comm. 71, 622 - 627, (1976)
42. Hems, R., Ross, B.D., Berry, M.N., Krebs, H.A., Biochem. J. 101, 284 - 292 (1966)
43. East, A.G., Louis, L.N., Hoffenberg, R., Exp. Cell Res. 76, 41 - 46 (1973)

44. Riebeling, V., . Dissertation, Med. Fak. Univ. Freiburg (1976)
45. Williams, J.A., Woodbury, D.M., J.Physiol. 212, 85-99 (1971)
46. Barnabei, O., Lenghissa, G., Tomasi, V., Biochim. Biophys. Acta 362, 316 - 325 (1974)
47. Van Berkel, T.J.K., Kruijt, J.K., Koster, J.F., Eur. J. Biochem. 58, 145 - 152 (1975)
48. Sleyster, E.C., Westerhuis, F.G., Knook, D.L. in : Kupffer Cells and other Liver Sinusoidal Cells (Hrsg. E. Wisse und D.L. Knook), Elsevier / North Holland, 289 - 298 (1977)
49. Chang, R.S., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87, 440 - 454 (1954)
50. Sato, G., Zaroff, L., Mills, L.E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46, 963 - 969 (1960)
51. Malamud, D. in : The Cell Cycle and Cancer (Hrsg. R. Baserga), M. Dekker, New York, 137 - 141 (1971)
52. Watanabe, H., Progr. Liver Dis. 3, 49 - 58 (1970)
53. Tashijan, A.H., Bancroft, F.C., Richardson, U.I., Goldlust, M.B., Rommel, F.A., Ofner, P., In Vitro 6, 32 - 43 (1970)
54. Aviv, D., Thompson, E.B., Science 177, 1201 - 1203, (1972)
55. Church, R.B., McCarthy, B.J., J. Mol. Biol. 23, 477-486 (1967)
56. Stanislawski-Birencwajg, M., Uriel, J., Grabar, P., Canc. Res. 27, 1990 - 1997 (1967)

57. Bissell, D.M., Hammaker, L.E., Meyer, U.A., J. Cell Biol. 59, 722 - 734 (1973)
58. Hirsiger, H., Gautschi, J.R., Schindler, R., Exp. Cell Res. 100, 356 - 364 (1976)
59. Wanson, J.C., Drochmans, P., Mosselmans, R., Ronveaux, M.F., J. Cell Biol. 74, 858 - 877 (1977)
60. Gebhardt, R., Bellemann, P., Mecke, D., Exp. Cell Res. 112, 431 - 441 (1978)
61. Katz, N., Jungermann, K, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 357, 359 - 375 (1976)
62. Von Krämer-Bryn, M., Oftebro, R., Exp. Cell Res. 69, 301 - 306 (1971)
63. Melly, M.A., Duke, L.J., Koenig, M.G., J. Reticulo-end. Soc. 12, 1 - 15 (1972)
64. Munthe-Kaas, A.C., Berg, T., Seglen, P.O., Seljelid, R., J. Exp. Med. 141, 1 - 10 (1975)
65. Munthe-Kaas, A.C., in : Kupffer Cells and other Liver Sinusoidal Cells (Hrsg. E. Wisse und D.L. Knook), Elsevier / North Holland, 325 - 332 (1977)
66. Munder, P.G., pers. Mitteilung
67. Freund, J., Annu. Rev. Microbiol. 1, 291 (1947)
68. Blackard, W., Nelson, N.C., Diabetes 19, 302 - 306 (1970)
69. Ohneda, A., Pareda, E., Eisentraut, A.M., Unger, R.H., J. Clin. Invest. 47, 2305 - 2322 (1968)
70. Mondon, C.E., Olefsky, J.M., Dolkas, C.B., Reaven, G.M., Metabolism 24, 153 - 160 (1975)

71. Bergeron, J.J.M., Levine, G., Sikstrom, R., Kopriva, B., Nadler, N.J., Posner, B. I., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5051 - 5055 (1977)
72. Buchanan, K.D., Solomon, S.S., Vance, J.E., Porter, J.P., Williams, R.H., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 620 - 632 (1968) 7
73. Freychet, P., Rosselin, G., Rancon, F., Fouchereau, M., Broer, Y., Horm. Metab. Res., Suppl.Ser. 5, 72 - 78, (1974)
74. Terris, S., Steiner, D.F., J. Biol. Chem. 250, 8389-8398 (1975)
75. Sonne, O., Berg, T., Christoffersen, T., J. Biol. Chem. 253, 3203 - 3210 (1978)
76. Cuatrecasas, P., Fed. Proc. 32, 1838 - 1846 (1973)
77. Freychet, P., Kahn, C.R., Roth, J., Neville, D.M.jr. J. Biol. Chem. 247, 3953 - 3961 (1972)
78. Rodbell, M., Krans, H.M.J., Pohl, S.L., Birnbaumer, L., J. Biol. Chem. 246, 1861 - 1871 (1971)
79. Wagle, S.R., Hofmann, F., Decker, K., Biochem. Biophys. Res. Comm. 72, 448 - 455 (1976)
80. Wincek, T.J., Hupka, A.L., Sweat, F.W., J. Biol. Chem. 250, 8863 - 8873 (1975)
81. Ferretti, E., Biondi, C., Tomasi, V., FEBS lett. 69, 70 - 74 (1976)
82. Gliemann, J., Sonne, O., J. Biol. Chem. 253, 7857 - 7863 (1978)
83. Schwartz, R.H., Bianco, A.R., Handwerger, B.S., Kahn, C.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 475 - 478 (1975)

84. Gavin, J.R., Roth, J., Jen, P., Freychet, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 747 - 751 (1972)
85. Fussganger, R.D., Kahn, C.R., Roth, J., De Meyts, P., J. Biol. Chem. 251, 2761 - 2769 (1976)
86. Bar, R.S., Kahn, C.R., Koren, H.S., Nature 265, 632 - 634 (1977)
87. Osborne, K.C., Monaco, M.E., Lippman, M.E., Kahn, C.R., Canc. Res. 38, 94 - 102 (1978)
88. Cuatrecasas, P., Desbuquois, B., Krug, F., Biochem. Biophys. Res. Comm. 44, 333 - 339 (1971)
89. Kono, T., J. Biol. Chem. 244, 5777 - 5784 (1969)
90. Posner, B.I., Josefsberg, Z., Bergeron, J.J.M., J. Biol. Chem. 253, 4067 - 4073 (1978)
91. Vigneri, R., Goldfine, I.D., Wonk, K.Y., Smith, G.J., Pezzino, V., J. Biol. Chem. 253, 2098 -2103 (1978)
92. Gordon, P., Carpentier, J.L., Freychet, P., LeCam, A. Orci. L. Science 200, 782 - 785 (1978)
93. Bergeron, J.J.M., Sikstrom, R., Hand, A.R., Posner, B.I. J. Cell Biol. 80, 427 - 443 (1979)
94. LeCam, A., Maxfield, F., Willingham, M., Pastan, I., Biochem. Biophys. Res. Comm. 88, 873 - 881 (1979)
95. Kahn, C.R., Baird, K., J. Biol. Chem. 253, 4900 - 4906 (1978)
96. Franke, W.W., Morré, D.J., Deumling, B., Cheetham, R.D., Kartenbeck, J., Jarasch, E.D., Zentgraf, H.W., Z. Naturforsch. 261, 1031 - 1039 (1971)
97. Le Marchand, Y., Patzelt, C., Assimacopoulos-Jeannet, F.,

- Loten, F.G., Jeanrenaud, B., J. Clin. Invest. 53, 1512 - 1517 (1974)
98. Carter, S.B., Endeavour 31, 77 - 82 (1972)
99. Zuurendonk, P.F., Tager, J.M., Biochim. Biophys. Acta 333, 393 - 399 (1974)
100. Howard, J.G. in: Mononuclear Phagocytes (Hrsg. R. van Furth), Oxford, 178 - 199 (1970)
101. Carr, I., in: Kupffer Cells and other Liver Sinusoidal Cells (Hrsg. E. Wisse und D.L. Knook), Elsevier / North Holland, 355 - 364 (1977)
102. Van Furth, R., Crofton, R.W., Diesselhoff-den-Dulk, M.M.C., a.a.O. 471 - 480
103. Deimann, W., Fahimi, D., a.a.O., 487 - 498
104. Gammeltoft, S., Christensen, L.O., Sestoft, L., J. Biol. Chem. 253, 8406 - 8413 (1978)
105. Desbuquois, B., Eur. J. Biochem. 53, 569 - 580 (1975)
106. Geelen, M.J.H., Gibson, D.M., FEBS lett. 58, 334 - 339 (1975)
107. Bernaert, D., Wanson, J.C., Drochmans, P., Popowski, A., J. Cell Biol. 878 - 900 (1978)
108. Chr. Barth, pers. Mitteilung
109. Petersen, B., Beckner, S., Blecher, M., Biochim. Biophys. Acta 542, 470 - 485 (1978)
110. Clark, J.M., Pateman, J.A., Exp. Cell Res. 112, 207 - 212 (1978)
111. Emeis, J.J., Planqué, B., J.Reticuloend.Soc.20, 11-29 (1976)

112. Bissell, D.M., Hammaker, L., Schmid, R., J. Cell Biol. 54, 107 - 119 (1972)
113. Wisse, E. in : Kupffer Cells and other Liver Sinusoidal Cells (Hrsg. E. Wisse und D.L. Knook), Elsevier / North Holland, 33 - 60, (1977)
114. D.L. Knook. pers. Mitteilung
115. Berg. T., Munthe-Kaas, A.C., Exp. Cell Res. 109, 119 - 125 (1977)
116. Munthe-Kaase, A.C., Berg. T., Seljelid, R., Exp. Cell Res. 99, 146 - 154 (1976)
117. Munthe-Kaas, A.C., Exp. Cell Res. 99, 319 - 327 (1976)
118. Terris, S., Hofmann, C., Steiner, D.F., Can.J.Biochem. 57, 459 - 468 (1979)
119. Vigneri, R., Pliam, N.B., Cohen, D.C., Pezzino, V., Wong, K.Y., Goldfine, I.D., J. Biol. Chem. 253, 8192-8197 (1978)
120. Papachristodoulou, D.K., Scott, G.S., Thomas, J.H., Biochem. Soc. Transact. 7, 657 - 659 (1979)
121. Wilkening, J., Nowack, J., Decker, K., Biochim. Biophys. Acta 392, 873 - 881 (1975)
122. Goldman, R., Exp. Cell Res. 99, 385 - 394 (1976)
123. Gavin, J.R., Gorden, P., Roth, J., Archer, J.A., Buell, D.A., J. Biol. Chem. 248, 2202 - 2207 (1973)
124. Hofmann, F., Decker, K., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 905 - 912 (1979)
125. Reik, L., Petzold, G.L., Higgins, J.A., Greengard, P., Barnett, R.J., Science 168, 382 - 384 (1970)

126. Naito, M., J. Jap.Soc. RES 16, 25 (1976)
127. Gale, P.G., Sparkes, R.S., Golden, P.W., Science 201, 937 - 938 (1978)
128. Krebs, H.A., Henseleit, K., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33 - 66 (1932)
129. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)
130. Dulbecco, R., Vogt, M., J. Exp. Med. 99, 167 (1954)
131. Morgan, J.F., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 73, 1 (1950)
132. Bray, G.A., Anal. Biochem. 1, 279 - 285 (1960)
133. Lamprecht, W., Trautschold, I., in : 'Methoden der enzymatischen Analyse' (Hrsg. H.U. Bergmeyer) Verlag Chemie, 3.Auflage (1974) S.2151 - 2160
134. Keppler, D., Gawehn, K., Decker, K., a.a.O., S.2222 - 2228
135. Keppler, D., Decker, K., a.a.O., S. 2276 - 2279
136. Keppler, D., a.a.O., S. 2138 - 2146
137. Fawcett, J.K., Scott, J.E., J.Clin.Path. 13, 156 - 159 (1960)
138. Schmidt, E., in: 'Methoden der enzymatischen Analyse' (Hrsg. H.U. Bergmeyer), Verlag Chemie, 3.Aufl. (1974) 689 - 696
139. Bergmeyer, H.U., Bernt, E., a.a.O., S. 607 - 612
140. Bradford, M.M., Anal.Biochem. 72, 248 - 254 (1976)
141. Ceriotti, A., J.Biol.Chem. 198, 297 - 301 (1952)

142. van Berkel, T.J.C., Kruijt, J., in: 'Kupffer Cells and other Liver Sinusoidal Cells' (Hrsg. E.Wisse und D.L. Knook), Elsevier / North Holland, 307 - 314 (1977)
143. Laemmli, U.K., Nature New Biol. 227, 680 - 685 (1970)
144. Weber, K., Osborn, M., J.Biol.Chem. 244, 4406 - 4412 (1969)

LEBENS LAUF

- 9.9.1950 Geboren in Lübeck als erstes Kind des
Dr.med.Erdmann Kreusch und der Dr.med.
Ingeborg Kreusch geb. Hoffmann
- 1957 - 1960 Besuch der Evangelischen Volksschule in
Bad Pyrmont
- 1960 - 1965 Besuch des Bad Pyrmonter Realgymnasiums
- 1966 - 1968 Besuch des Felix-Klein-Gymnasiums in Göt-
tingen, Reifeprüfung im math.nat.Zweig
- 1968 - 1973 Chemiestudium an der Universität Göttingen
- 1971 Diplomchemiker-Vorprüfung
- 1973 Diplomchemiker-Hauptprüfung, Thema der
Diplomarbeit: "Untersuchungen zu Neben-
produkten des Diosgeninabbaus".
- 1971 - 1973 Medizinstudium an der Universität Göttingen
- 1973 Ärztliche Vorprüfung
- 1973 - 1979 Wissenschaftlicher Assistent am Biochemi-
schen Institut der Universität Freiburg bei
Prof.Dr. Karl Decker
- 1976 - 1978 Medizinstudium an der Universität Freiburg
- 1978 Medizinisches Staatsexamen
- 1979 Medizinassistent an der Inneren Abteilung
des Kreiskrankenhauses Müllheim/Bad.
- 1979 Medizinassistent an der Chirurgischen Ab-
teilung des Kreiskrankenhauses Emmendingen





